

A tömegspektrometria kvalitatív és kvantitatív proteomikai alkalmazása

Ph.D. értekezés

Szájli Emília

Dr. Medzihradszky-Fölkl Katalin

Témavezető

Kémia Doktori Iskola

SZTE TTIK

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ

Proteomikai Kutatócsoport

Szeged

2008

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés	3
1.1. Témafelvetés	3
1.2. A Tömegspektrometria	4
1.2.1. MALDI-TOF MS	6
1.2.2. ESI és LC/MS-MS	10
1.3. A proteomika és a tömegspektrometria kapcsolata	12
2. MALDI-TOF MS kvantitatív jellegének tanulmányozása	24
2.1. Elméleti áttekintés	24
2.2. Célkitűzés	26
2.3. Kísérleti rész	27
2.3.1. Vegyszerek és felhasznált anyagok	27
2.3.2. Mintaelőkészítés	28
2.3.3. A tömegspektrometriás mérések kivitelezése	30
2.3.4. A mérési adatok kinyerése és feldolgozása	31
2.3.4.1. A kiértékelés során alkalmazott programok és fontos összefüggések	31
2.3.4.2. Statisztikai kiértékelések során alkalmazott alapfogalmak	33
2.3.4.3. Statisztikai kiértékelések során alkalmazott módszerek	37
2.4. Eredmények	41
2.4.1. A szuppresszió hatásának és az egyes méréssorozatok linearitásának tanulmányozása	41
2.4.2. A kvantitatív mérések reprodukálhatóságának tanulmányozása	44
2.4.3. Két, állandó koncentrációban jelenlévő peptid relatív intenzitásai közötti korreláció vizsgálata	49
2.4.4. Különböző körülmények között adott peptidre vonatkozó regressziós egyenesek összehasonlítása	49
2.4.5. Kvantitatív mérések tanulmányozása stabil-izotóppal jelölt peptid alkalmazásával	51
2.5. Eredmények tárgyalása	56
2.5.1. A szuppresszió hatásának és az egyes méréssorozatok linearitásának tanulmányozása	56
2.5.2. MALDI-TOF MS kvantitatív jellegének a tanulmányozása	57
3. Poszt-transzlációs módosítás vizsgálata	62
3.1. Elméleti áttekintés	62
3.2. Célkitűzés	65
3.3. Kísérleti rész	65
3.3.1. Vegyszerek és egyéb felhasznált anyagok:	65
3.3.2. Mintaelőkészítés	66
3.3.3. A tömegspektrometriás mérések kivitelezése	68
3.3.4. A mérési adatok kinyerése és feldolgozása	69
3.4. Eredmények	74
3.5. Eredmények tárgyalása és diszkusszió	81
4. Összefoglalás	85
5. Summary	90
Köszönetnyilvánítás	94
Referenciák	95
Melléklet	Error! Bookmark not defined.

Rövidítések jegyzéke

ACN: acetonitril

BSA: marha szérum albumin (Bovine Serum Albumin)

cfu: telepképző egység (Colony Forming Unit)

CHCA: α -ciano-4-hidroxifahéjsav

CID: Collision-Induced Dissociation

DTT: ditiotritol

ESI: elektroporlasztásos ionizáció (ElectroSpray Ionization)

FA: hangyasav (Formic Acid)

Fet: fetuin

FT-ICR MS: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography

IAM: jódacetamid

LDI-: lézerdeszorpciós ionizációs eljárás (Laser Desorption Ionization)

MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

MIDAS: MRM-Initiated Detection And Sequencing

MRM: Multiple Reaction Monitoring

MSQ: Mean of Squares

NCBIInr: National Center for Biotechnology Information non-redundant database

P: TGP^NLHGLFGR peptid, a citokró^m C triptikus peptidje

P*: TGP^NL*HGLFGR peptid citokró^m C triptikus peptidjének stabil-izotóppal jelölt származéka, ahol az izotóp kompozíció: Leu (L)*-¹³C₆, 98%; ¹⁵N, 98%.

PSD: Post Source Decay

PTMs: Poszt-transzlációs módosítások (Post-Translational Modifications)

Q-TOF: Quadrupole – orthogonal acceleration - time-of-flight

SD: Szórás, Standard Deviáció

S.E.: középérték szórása, Standard Error

SUMO: Small Ubiquitin-Like Modifier protein

SSQ: Sum of Squares

TFA: trifluorecetsav (Trifluoroacetic Acid)

TOF: Time-of-Flight

1. Bevezetés

1.1. Témafelvetés

Az SzBK Proteomikai Kutatócsoportjában peptidkeverékek vizsgálata folyik biológiailag releváns mintákból. A keverékek MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) tömegspektrometriás analízise során tapasztalt, illetve már számos publikáció által is tárgyalt szuppressziós jelenségek arra ösztönözték a csoportot, hogy megvizsgálja, hogy bizonyos faktorok figyelembe vételével megjósolható-e, hogy mi detektálható egy elegyből. A közhit szerint bázikusabb, nagyobb hidrofóbicitású peptidek biztosabban detektálhatók, ezért ezeknél a vizsgálatoknál elsősorban ezekkel a faktorokkal számoltunk a peptid hosszának figyelembe vétele mellett. A kapott eredmények felhasználásával egyes kísérletek, azonosítások megbízhatóbbá tételét reméltük: úgy gondoltuk, ha találunk bizonyos számszerű mutatókat, amelyek azonosítják a jobban detektálható peptideket, akkor a fehérjeazonosítás megbízhatósága is jelentős mértékben növelhető lenne. Nem utolsó sorban a kvantitatív meghatározások során is előnyös lenne a meghatározandó fehérje lehetséges proteotipikus peptidjeinek ismerete. Ezek a fehérjére jellemző peptidek, amelyek adott ionizációs technikával és műszerrel reprodukálhatóan intenzív jelet adnak. Ezen a vonalon végül is megakadtak, még egyszerűbb elegyek esetében sem szimplán a bázicitás, vagy/és hidrofóbicitás határozza meg az összetevők relatív intenzitását (Hajnal Andrea, nem publikált eredmények). Vizsgálódásunk másik célpontja a MALDI-TOF tömegspektrometria kvantitatív felhasználhatósága volt, hiszen a módszer előszeretettel használt frakcionálatlan elegyekben, sőt sejteken és szövetekben is, kvalitatív és kvantitatív analízisre egyaránt. A munkába ezen a ponton kapcsolódtam be.

A minta előkészítéssel kapcsolatos tanulmányaim szorosan kapcsolódnak egyéb feladataimhoz, fehérjék azonosításához (1) és bizonyos poszt-transzlációs módosítások tanulmányozásához. Fehérjék azonosítása tömegspektrometriás adatokból mára már rutin feladatnak tekinthető. Kovalens módosítások azonosítása azonban még mindig kihívást jelentő feladat. A poszt-transzlációs módosítások jelenléte a genomból mai tudásunk alapján nem megjósolható. Bizonyos esetekben a poszt-transzlációs módosítás jelenléte egy adott konszenzus szekvenciához köthető, ami megkönnyíti annak vizsgálatát. Ennek a szekvenciának a jelenléte egy adott fehérjében csak a módosítás lehetőségét veti fel, de nem ad bizonyosságot a jelenlétéről, ahhoz további vizsgálatok szükségesek. Erre jó példa az

AsnXxxSer/Thr (ahol Xxx nem lehet prolin) konszenzus szekvencia az N-glikozilációnál, de ugyanakkor nem minden konszenzus szekvenciában lévő Asn glikozilált. Egy kovalens módosítás többnyire megváltoztatja a peptid kromatográfiás tulajdonságait, MS viselkedését (pl., fragmentálódás), ezért mindig valamilyen célzott módszert ajánlott alkalmazni a vizsgálatukhoz. Továbbá sok kovalens módosítás csupán a fehérjepopuláció egy részét, néha csak töredékét érinti, ezért gyakran fel kell dúsítani a módosított peptideket, hogy detektálhassuk őket. Munkám során bizonyos fehérjék ubiquitinálásának tanulmányozásával foglalkoztam. Ubiquitinálási hely meghatározására azonban nem áll rendelkezésre speciális dúsítás (peptid szinten), tehát a vizsgált fehérjék on-line vagy off-line frakcionálásával, alternatív ionizációs technikák használatával, célzott MS/MS analízissel igyekeztük az ubiquitinálás helyét meghatározni.

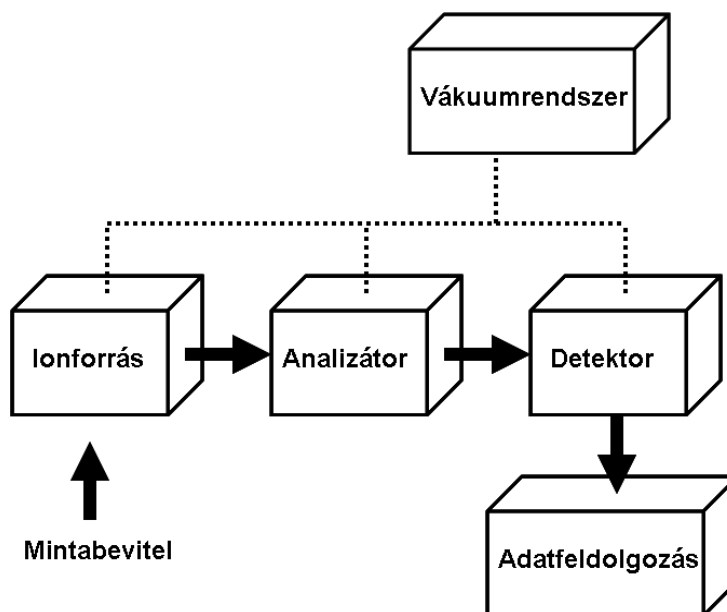
1.2. A Tömegspektrometria

A tömegspektrometria az utóbbi időben hatalmas fejlődésen ment keresztül és egyre szélesedő területet fed le, ezért kis történeti bevezetés után csak az általam is alkalmazott technikákra összpontosítva szeretném tárgyalni az alábbiakban. A tömegspektrometria kialakulása J. J. Thomson nevéhez fűződik (2). Megfigyelte, hogy ionizációt követően az elektromos térben felgyorsított pozitív töltésű gázionok mágneses térben eltérő röppályán haladnak, aminek következtében különböző helyen csapódnak be a detektorba, lehetővé téve így a megfelelő energiájú elektronnyalábbal bombázott mintából keletkező ionok molekulatömeg/töltés (m/z) alapján történő szortírozását. A tömegmérésen alapuló fehérjevizsgálati módszer alapvető feltétele tehát egy megfelelő ionizációs eljárás kifejlesztése volt, amely során az analizálandó molekula ionizálódik és gázfázisba jut bomlás nélkül és analizátor alkalmazásával (természetesen vákuumban) a keletkezett ionok elkülöníthetők. Az első tömegspektrométerek elektronsugárral ionizálták a vákuumba párologtatott mintákat, így csak kis molekulatömegű, nem poláros, illékony molekulák analízisére szolgáltak. Biológiai szempontból például zsírsavak, metabolitok vizsgálatára voltak megfelelőek. Ezek a készülékek a nagyobb molekulatömegű és poláris molekulák, hőérzékeny anyagok, pl. a biomolekulák, biopolimerek analízisét nem tették lehetővé, mivel nem állt rendelkezésre olyan ionizációs módszer, amely során ezeknek a mintáknak az ionizációja és gázfázisba történő bevitele bomlás nélkül ment volna végbe. Újabb és újabb

ionizációs technikák kifejlesztését követően (Fast Atom Bombardment, FAB; Plazmadeszorpciós, PD-; lézerdeszorpciós, LDI-ionizáció) a biopolimerek szempontjából a legnagyobb áttörést két új ionizációs eljárás kifejlesztése jelentette az 1980-as évek végén. Az egyik, a mátrix által segített lézerdeszorpciós ionizáció (MALDI) Hillenkamp és Karas nevéhez fűződik (1988), akik az újonnan kifejlesztett MALDI forrást repülési idő analízátorhoz (time-of-flight, TOF) kapcsolták (3). A nemzetközileg elfogadott és használt rövidítése a MALDI, illetve MALDI-TOF, ezért a későbbiekben én is ezeket fogom használni. Az új készülék már lehetővé tette 10 kDa molekulatömegű minták analízisét. A lézerdeszorpciós ionizációhoz való alkalmazásáról először Koichi Tanaka számolt be (1987), akit ezért az újításáért 2002-ben Nobel-díjjal jutalmaztak. A másik nagy újítást Fenn és munkatársai által kifejlesztett (1989) elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization, ESI) jelentette (4), amiért 2002-ben ő is Nobel-díjat kapott. A MALDI és az ESI kis- és nagymolekulák ionizációjára egyaránt alkalmas eljárások és napjainkban ezt a két kíméletes, úgynevezett „soft” ionizációs technikát alkalmazzák proteinek és peptidek analízise során.

Az ionizációs módszerekkel párhuzamosan az analízátorok is nagy fejlődésen mentek keresztül. Nehéz fejlődési sorrendbe tenni őket, mert az egyes analízátorok közel egyidejűleg voltak használatban az ionizációtól, vegyülettől függően: mágneses, kettős fókuszálású (egy mágneses és egy elektrosztatikus analízátor kombinálása), kvadrupól (Q), TOF, reflektron TOF, 3D és lineáris ioncsapda, Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia analízátor (FT-ICR) és orbitrap. A kettős fókuszálású tömegspektrométereket megkülönböztethetjük geometriájuk és a szektorok elhelyezkedése alapján: Mattauch-Herzog (1935) és Nier-Johnson (1953), vagy Matsuda (1981) geometriával épült, illetve hagyományos (EB) és fordított (BE) kettős fókuszálású tömegspektrométer (5). Az energia (kinetikus energia) és tömeg szerinti fókuszálás nagyobb felbontást eredményezett az 1950-es években a hagyományos szektor típusú készülékekhez képest. A repülési idő analízátor például reneszánszát éli, amióta pontosan tudjuk az órát indítani és a korszerű komputerek lehetővé teszik a gyors adatgyűjtést (a MALDI-TOF mintavételi gyakoriság a legnagyobb felbontásnál: 0.5 nsec). Továbbá rájöttek, hogy folytonos ionképződés mellett is alkalmazható, amennyiben az ionok elsődleges gyorsítási irányára merőlegesen helyezik el a TOF analízátort és megfelelő „kinyomó” elektród segítségével ionsomagokat gyártanak (6,7). Az analízátorok a mai napig is az alkalmazott technikától függően jutnak szerephez. A tömegspektrométerek meghatározó paraméterei a detektálási érzékenység, tömeg-felbontóképesség ($R=m/\Delta m$), a tömegmérés pontossága és a prekursor ion választása egy keverékből is (tandem MS vagy MS/MS analízis) (5,8-10). A tömegspektrometria fejlődésének rövid összefoglalása a (11)

referenciában bővebben megtalálható. A ma alkalmazott tömegspektrométerek felépítésének sematikus vázlata az **1. ábrán** látható.

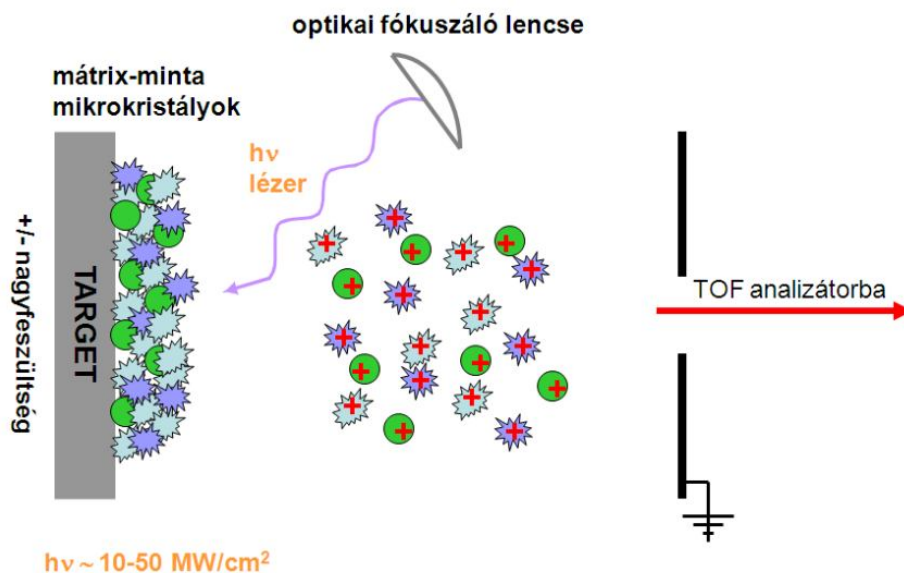


1. ábra A tömegspektrométerek vázlatos felépítése.

Munkám során SCOUT 384 ionforrással és pulzáló nitrogén lézerrel (337nm) felszerelt Bruker Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométert (Bruker Daltonics, Karlsruhe, Germany) és Agilent 1100 nanoLC rendszerrel on-line kapcsolt Agilent XCT plus ioncsapda készüléket használtam, ezért a következőkben ezekkel kapcsolatos elméletre és mérési paraméterekre térek ki részletesebben.

1.2.1. MALDI-TOF MS

A MALDI során a mintát egy UV-elnyelő anyaggal elegyítik (mátrix), a keverék a száradás során kristályelegyet képez. A mátrix elsődleges szerepe a beeső lézersugárzás abszorbeálása, amely a mátrix-minta kristály gyors (femtoszekundumos) felmelegedését eredményezi. Ez a folyamat a mátrix és a mintában lévő komponensek gázfázisba történő deszorpciójához vezet (**2. ábra**). A minta ionizációjának a mechanizmusa, a proton-transzfer még máig sem tisztázott (lásd 2. fejezet, Elméleti áttekintés).

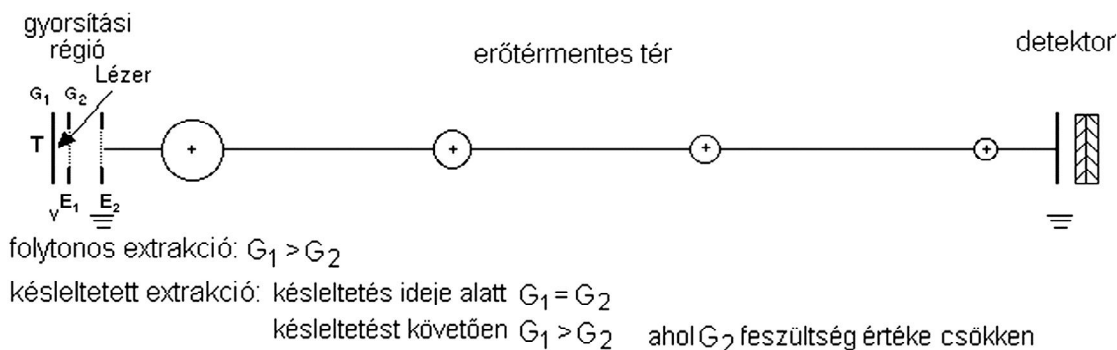


2. ábra A mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció (MALDI).

Az ionizáció nem egy időpillanatban történik és az ionizáció során keletkezett ionok energia eloszlása sem egyenletes az ionizált molekulák sorozatos ütközése révén. Ezért az azonos tömeggel rendelkező ionok nem azonos időben érik el a detektort, ami pedig a csúcs szélesedését eredményezi, azaz a tömeg-felbontás alacsony. Ennek a jelenségnek a csökkentésére, illetve kiküszöbölésére, azaz a felbontás növelésére, a következő kettős fókuszálást fejlesztették ki:

1. késleltetett extrakció alkalmazása (delayed extraction)
2. elektronikus „tükör” alkalmazása (iontükör, reflectron mode)

A késleltetett extrakció (lásd **3. ábra**,) (12) során egyrészt elveszítjük a mátrix egy részét, másrészt az ionizált molekulák szinte felsorakoznak a gyorsításra. A MALDI-TOF tömegspektrométerrel történő mérések során alkalmazott késleltetett extrakció egyrészt kiküszöböli a különböző időpillanatban történő ionizációból adódó problémákat, másrészt az energia fókuszálása révén jobb tömegpontosságot és nagyobb felbontást eredményez. Az általunk alkalmazott Bruker készülék estében ezt szabadalmi okok miatt pulzáló ion-extrakciónak nevezték el (Pulsed Ion Extraction, PIE).

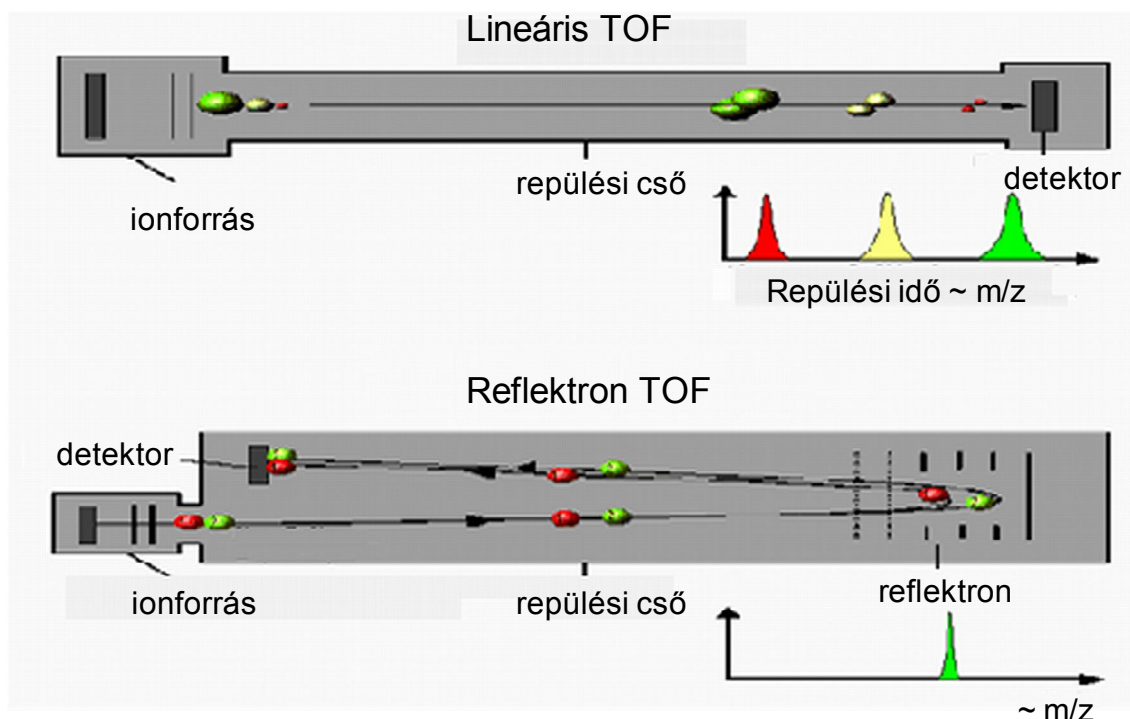


3. ábra A késleltetett extrakció. A feszültség az ionforrásban két részből tevődik össze. Az egyik a target (T) és az első extrakciós rács (E_1 , G_2 feszültség), a másik az első és második extrakciós rács (E_2 feszültsége) közötti gyorsító feszültség révén. A működési potenciál értéke függ a működés módjától (pozitív, negatív) és a mérendő ionok tömegétől. A MALDI-TOF analízisek során általunk alkalmazott mérési paramétereket lásd a 2. Fejezet, Kísérleti részben.

Az ionok gyorsítása két lépésben történik: a target (T) és az 1. extrakciós rács, illetve az 1. és 2. extrakciós rács között. A késleltetett extrakció során a MALDI ionizáció során keletkező ionok extrakciója nem közvetlenül az ionizáció pillanatában történik, hanem bizonyos idő (pl., 200 ns) elteltével, az ionizáció során keletkező (azonos m/z) ionok eltérő sebességének, időbeli és térbeli eloszlásának kompenzálására. A késleltetés ideje alatt a target és az 1. extrakciós rács között a tér erőtermentes ($G_1 = G_2$), majd a késleltetést követően az extrakciós rács feszültségét (G_2) csökkentve az ionok elsődleges gyorsítása történik. A lézerlövés hatására keletkezett ionok eltérő sebességgel szabadon terjeszkednek a vákuumba, aminek következtében az azonos tömeggel rendelkező ionok is eltérő pozícióban helyezkednek el T és E_1 között. A kisebb kezdeti sebességű (ionizáció során kevesebb kinetikus energiára szert tett) ionok közelebb helyezkednek el a „taszító elektródhoz” azaz a targethez, míg a gyorsabb ionok távolabb vannak a feszültségkülönbség alkalmazásának pillanatában. A targethez közelebb lévő ionok nagyobb mozgási energiára, a távolabb elhelyezkedő ionok kisebb mozgási energiára tesznek szert az elsődleges gyorsítás során, aminek következtében az ionizáció során fellépő sebességkülönbség, és térbeli eloszlás különbségek kompenzálódnak. Az ionizáció nem egyetlen időpillanatban történik, azaz időbeli heterogenitást mutat. Miután az ionok gyorsítása a lézer-impulzus alkalmazását némi késéssel követi, így a némi időbeli eltéréssel képződött ionok már mind, egyszerre készen állnak a gyorsításra. Míg a kinetikus energia különbség kompenzálására a reflektoron is képes, addig az ionok képződésének időbeli eloszlását csak a késleltetett extrakcióval tudjuk kiegyenlíteni. Az 1. és 2. extrakciós rács

között fennálló potenciálkülönbség eredményezi az ionok további gyorsítását. A késleltetés során ugyanakkor a sűrű gázfelhő széteszlása következtében az ütközések száma csökken, ami az ütközések okozta energia-eloszlás szélesedés mértékének csökkentésével jár. Ez szintén a csúcsok keskenyedését, azaz nagyobb felbontást eredményez.

A laboratóriumban rendelkezésre álló MALDI-TOF tömegspektrométer működtethető lineáris és reflektoron módban egyaránt. Ennek a két módnak az elvi vázlatát és a reflektoron mód alkalmazásának előnyét a 4. ábra szemlélteti. Lineáris módban az azonos tömegű, de eltérő kinetikus energiával rendelkező komponensek eltérő időben csapódnak a detektorba, ami csúcshélesedéshez vezet. Reflektoron alkalmazása esetén a gyorsabb (nagyobb kinetikus energiával rendelkező) ionok jobban behatolnak az iontükörbe, míg a lassúbb ionok kevésbé, így az eredetileg eltérő kinetikus energiával rendelkező, de azonos tömegű komponensek közel azonos időben érik el a detektort, ami a csúcs keskenyedését eredményezi.



4. ábra A MALDI-TOF készülék működési elve lineáris és reflektoron módban.
<http://www.jic.ac.uk/SERVICES/proteomics/tof.htm>

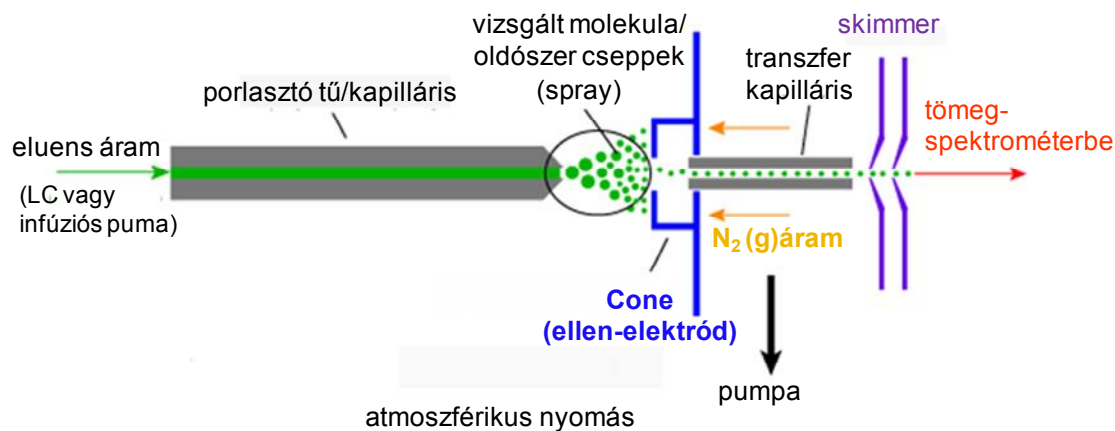
Lineáris módban történő analízis szélesebb tömegtartományban (> 1 MDa) alkalmazható, ugyanakkor hátrányai közé tartozik alacsony felbontóképessége és a tömegmérés alacsony pontossága, továbbá nem alkalmas MS/MS analízisre. Előnye, hogy a minta bármiféle bomlása a repülési csőben, azaz az erőtermentes (field free) régióban nem befolyásolja a

komponensek detektálhatóságát: bár a komponensek tömege csökken, sebességük már nem változik, így egyszerre érnek célba.

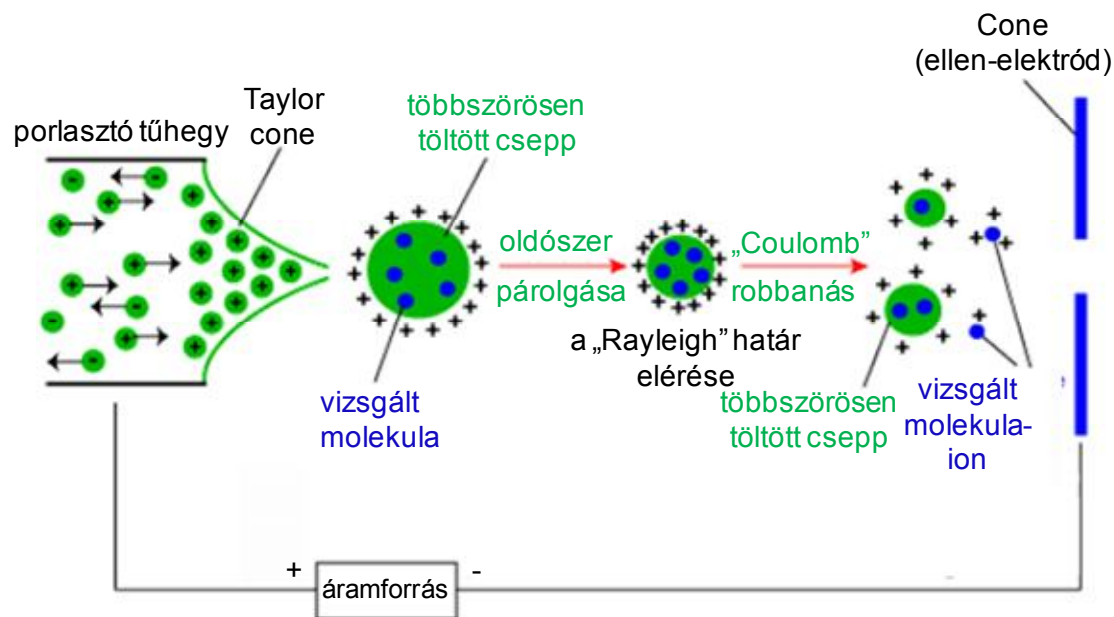
A reflektron mód alkalmazhatóságának a nagymolekulák bomlása szab határt, ami $m/z = \sim 4000$ Da. A forrásban, illetve a repülési csőben többlet vibrációs energiára szert tett nagymolekulák bomlása (pl., NH_3 , H_2O vesztes) révén keletkezett tömegkülönbség a kinetikus energia csökkenéséhez vezet, ami viszont maga után vonja a fókuszálás romlását, a sávszélesedést, azaz a pontosság és a felbontás csökkenését. A MALDI-TOF mérések pontossága külső kalibráció esetében 200 ppm-en belül van, de belső kalibráció alkalmazásával jelentős mértékben javítható (10-20 ppm). Az iontükör további jelentősége, hogy lehetővé teszi fragmentációs spektrum (MS/MS, ebben az esetben az úgynevezett post source decay, PSD) felvételét, ahol a MALDI nem teljesen kíméletes karakterét használjuk ki. A fragmentációs spektrum felvétele a feszültség megfelelő változtatása mellett a monomolekuláris bomlást kihasználva, annak követésével történik.

1.2.2. ESI és LC/MS-MS

A biomolekulák analízise szempontjából fontos, másik előrelépést jelentő ionizációs mód az ESI. Ez egyaránt lehetővé teszi kis és nagy molekulatömegű biopolimerek (peptidek, proteinek, szénhidrátok, DNS fragmensek) és lipidek vizsgálatát is. Az ionizáció (**5. ábra**) során a minta bevitele a tömegspektrométerbe közvetlenül történik, folyamatosan, folyadék formában, lehetővé téve on-line összekapcsolását HPLC-vel, vagy kapilláris elektroforézissel. A mintát tartalmazó oldat az ellen-elektróddal szemben nagy potenciálkülönbséggel (0.8-5.5kV készüléktől és ESI típusától függően) rendelkező tűt töltött részecskékből álló spray formájában hagyja el (**5.a ábra**). A részecskék töltése megegyezik a tű töltésével, aminek következtében az taszítja a részecskéket az ellen-elektródon lévő negatív töltés felé. Az ionizáció atmoszférikus nyomáson történik, majd a keletkezett ionok a cone gombostűfejnyi nyílásán jutnak a már nagy vákuumban üzemelő analizátorba. A tű és az elektród között az oldószer elpárolog – ezt többnyire N_2 gázfüggönnyel (az ionok mozgására merőleges áramlási iránnyal) segítjük elő. Az oldószer párolgása során a töltéssel rendelkező cseppek addig zsugorodnak, amíg a felületi feszültség még fent tudja tartani a töltést, majd a cseppek a Coulomb robbanás következtében szétesnek **5.b ábra**. Ez a folyamat egészen addig ismétlődik meg, amíg nem vezet a töltéssel rendelkező (egyszeresen, vagy többszörösen töltött) csupasz molekuláig.



5.a



5.b

5. ábra Az elektroporlasztásos ionizáció (ESI) a, Az ESI interface b, Az elektroporlasztásos ionizáció mechanizmusának sematikus ábrája. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>

Az elektroporlasztásos ionizáció során a peptidekből többnyire többszörösen töltött ionok keletkeznek, amelyek könnyebben fragmentálódhatnak (13). Másik előnye, hogy a többszörösen töltés miatt a mérendő ionok tömege (m/z) beleesik az optimális mérési tartományba, tehát nagyobb molekulák detektálhatók relatíve kis mérési tartománnyal rendelkező készülékekkel. Az MS/MS analízis során a fragmentációra kiválasztott peptidek ütközéses aktiválása az ütközési cellában történik. A peptidek aktiválását az alkalmazott

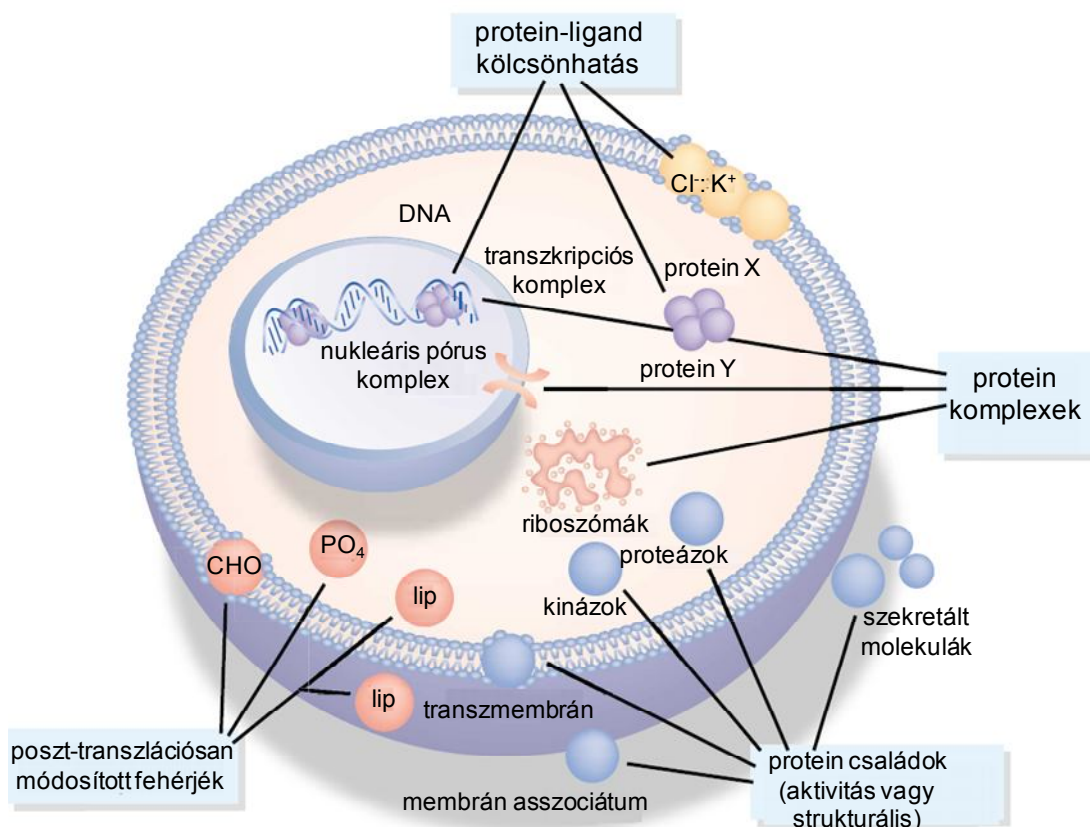
módszertől/műszertől függően ütközés által kiváltott disszociációnak (collision-induced dissociation, CID), elektron-transzfer disszociációnak (Electron Transfer Dissociation, ETD), elektron befogás indukálta disszociációnak (electron-capture dissociation, ECD) és infravörös multifoton disszociációnak (Infrared Multiphoton Dissociation, IRMPD) nevezzük. A két utóbbi módszer csak FT-ICR készülékeken használatos. A tandem MS/MS mérések történhetnek térben (pl., Q-TOF) és időben (pl., ioncsapda) elkülönítve egyaránt.

A tömegspektrometria összetett minták esetében önmagában nem elegendő vizsgálati módszer, ezért gyakran kapcsolják különböző elválasztási módszerekhez (gázkromatográfia GC-MS, folyadékkromatográfia LC-MS, HPLC-MS). A fehérjeanalízis szempontjából a folyadékkromatográfia-tömegspektrometria rendszerek (LC-MS, LC-MS/MS) a jelentősek, mivel lehetővé teszik nem, vagy kevésbé illékony komponenseket tartalmazó komplex minták összetevőinek elválasztását a minta tömegspektrométerbe kerülését megelőzően. A leggyakrabban alkalmazott ionizációs módszerek LC-MS esetén az ESI és az atmoszférikus kémiai ionizáció (APCI) pozitív és negatív módban egyaránt. Az MS mérést megelőző (leggyakrabban) fordított fázisú folyadékkromatográfia során alkalmazott puffernak nem célszerű kevésbé, vagy nem illékony sókat (pl., foszfát) tartalmaznia. A mintával szemben támasztott főbb követelmények: oldékonyság, stabilitás oldott állapotban, nem illékony puffertől, detergenstől, sóktól stb. való mentesség.

1.3. A proteomika és a tömegspektrometria kapcsolata

A proteomika (proteins → proteome → proteomics) kifejezés bevezetése Marc Wilkins nevéhez fűződik (14,15). A proteomika a sejtekben, a szövetekben, a szervezetben lévő fehérjeállomány (proteome) vizsgálatát jelentette. A bővülő vizsgálati lehetőségek révén a proteomika eredeti jelentése több szempontból is tágabb értelmet nyert. A proteomika változó bonyolultságú fehérje elegyek vizsgálatát jelentheti, egyre növekvő hangsúlyt fektetve a kvantitatív aspektusra (fehérje-expressziós vizsgálatok). Vizsgálhatunk olyan fehérjéket, amelyek bizonyos típusú komplexet képeznek (fehérje-DNS, fehérje-fehérje, vagy fehérje-kismolekula kölcsönhatás, **6. ábra**), azonos folyamatban vesznek részt (szignál transzdukció, sejtciklus kontroll), vagy azonos típusú poszt-transzlációs módosulást viselnek (diszulfidkötés kialakulása, oxidáció, glikoziláció, foszforiláció, ubiquitináció, acetiláció, metiláció, hidroxiláció, nitroziláció, szulfatálás). A proteomika célja a sejtfolyamatok, szabályozó folyamatok és betegségek mechanizmusának megismerése; egyes gének és termékeik sejtbeli

funkciójának meghatározása és megértése (funkcionális genomika) a fehérje szintjén (szekvencia, mennyiség, módosításai, kölcsönhatásai, aktivitása, szubcelluláris eloszlása és szerkezete révén) (6. ábra); továbbá biomarkerek keresése és gyógyszerfejlesztés.



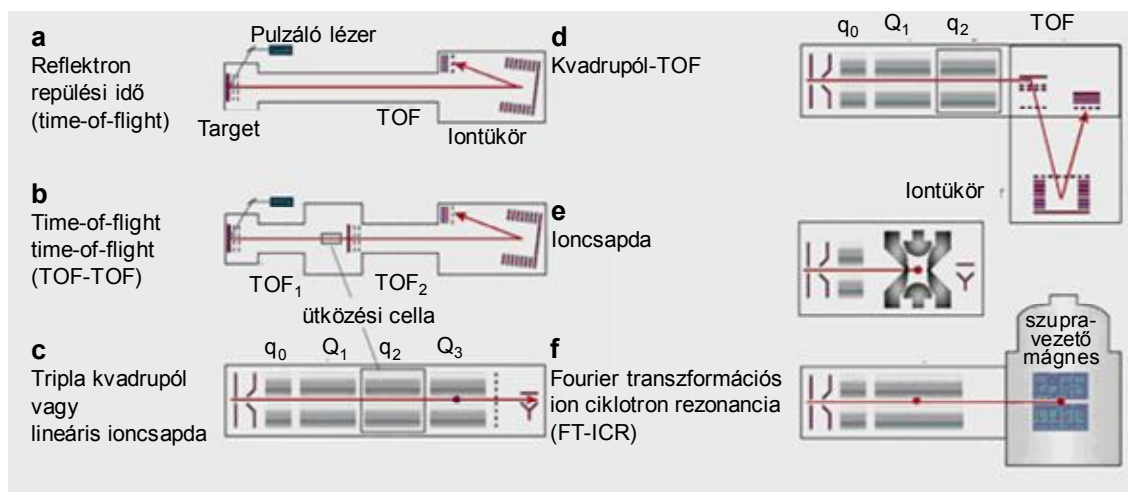
6. ábra Egy eukarióta sejt metszete és a fehérjék eloszlása. A sejt szisztematikus vizsgálata a proteomika területét képezi. A fehérjék szubcelluláris eloszlása, mennyisége, módosításai, kölcsönhatásai, katalitikus aktivitása és szerkezete hasznos információt szolgáltat a biológiai rendszer leírásához. (16)

A fehérjeszintézis nemcsak a transzláció szintjén szabályozott, hanem a transzkripció, és a legtöbb esetben az akkumulációs, transzlokációs és degradációs folyamatok révén is. Közismert már, hogy a gének száma az alternatív splicing, alternatív promóter miatt sem azonos a fehérjék számával. Azaz a biológiailag aktív fehérjék olyan poszt-transzlációs módosítások során jönnek létre, amelyekért számos intracelluláris reakció tehető felelőssé. A fehérjék sokrétűsége, heterogenitása, amelyhez a tehát a genetikai kódon kívül egyéb regulációs folyamatok is jelentős mértékben hozzájárulnak, megnehezíti a fehérjeminták analízisét. A fehérjék módosításai jelentős mértékben megnövelik a funkcionálisan aktív fehérjék változatosságát és ugyanakkor az elsődleges szerkezet variabilitása megváltoztatja az adott fehérje fizikai tulajdonságait (oldékonyság, izoelektromos pont, molekulatömeg),

lehetetlenné téve egy általános mintakezelési eljárás kifejlesztését és egy általánosan elfogadható és alkalmazható stratégia bevezetését. Mindemellett a mintában lévő egyes komponensek mennyisége széles tartományon belül mozoghat, ami megköveteli az alkalmazott módszer (már fentiekben is említett) nagy érzékenységet és széles dinamikus tartományát. Nem utolsó sorban a vizsgálatokat a rendelkezésre álló minta mennyisége is meghatározza (pl., betegből származó szövetminta esetében). Azonban ahhoz, hogy mindezeket vizsgálni tudjuk, a megfelelő technikák megteremtésére és továbbfejlesztésére volt és van még ma is szükség. A standard, nagyfelbontású fehérjeszeparációra alkalmas kétdimenziós (2D) gélelektroforézist, amely a fehérjék mennyiségi meghatározását is lehetővé teszi, O'Farrell (1975) (17), Klose (1975) (18) és Scheele (1975) (19) párhuzamosan, egymástól függetlenül fejlesztette ki. Ezt követően a 90-es években a tömegspektrometriában végbemenő fejlődés járult hozzá az MS-alapú proteomika megszületéséhez. A MALDI és ESI kifejlesztésével lehetőség nyílt biopolimerek tömegspektrometriás vizsgálatára (lásd Témafelvetésben). Újabb fontos lépést jelentettek azok a vizsgálatok, amelyek fehérjék proteolitikus hasítási termékeinek adatbázisban történő lekeresésén alapulnak (Henzel, 1989) (20). A fehérjék adott specificitású enzimmel, vagy kémiai úton való emésztése révén kapott peptidekhez a szekvenciájuknak megfelelő tömegek tartoznak. Ez azt jelenti, hogy adott szekvenciával rendelkező fehérje egy tömeglistát ad meghatározott emésztés során, amit az adatbázis lekeresések az adatbázisban lévő fehérjék elméleti emésztése során kapott peptidek tömeglistájával hasonlítanak össze. A fehérje-szekvencia adatbázisok robbanásszerű növekedése és a lekereső software-ek [SEQUEST (21) <http://fields.scripps.edu/sequest/index.html>, PeptideSearch <http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html>, Protein Prospector <http://prospector.ucsf.edu/>, Mascot (<http://www.matrixscience.com/home.html>, ProFound] megteremtése és továbbfejlesztése tovább segítette a tömegspektrometria-alapú fehérjeanalízist.

A fehérjekutatásban leggyakrabban alkalmazott két ionizációs eljárás a MALDI és az ESI, az analizátorok közül a TOF, az ioncsapda (három-dimenziós és lineáris ioncsapda), a kvadrupól és az FT-ICR a legjelentősebbek (9,10,16). Ezen analizátorokat önmagukban, vagy egymással kapcsolva is alkalmazzák (7. ábra), egyesítve az előnyös tulajdonságaikat. A MALDI ionforrást TOF-analizátorral, az ESI ionforrást pedig ioncsapdával (három-dimenziós és lineáris ioncsapda), vagy hibrid tandem tömegspektrométerrel [pl., kvadrupól-repülési idő (Q-TOF) készülék] kapcsolják leggyakrabban össze. A 7.a ábrán reflektron TOF készülék látható, amelyben a nagy kinetikus energiával rendelkező felgyorsított ionok elválasztása

eltérő sebességük alapján történik. Az azonos tömegű ionok mozgási energiaszórásának kompenzálására iontükröt alkalmaznak, majd ezt követően az ionok a sokszorozást és számlálást végző detektorba csapódnak. A **7.b ábrán** egy TOF-TOF készülék látható, ahol két TOF egység közé egy ütközési cellát helyeztek. Az első TOF adott m/z tömegű ionokat enged át, majd az adott ionok ütközési cellában történő fragmentálódása során keletkező fragmens ionok elválasztása a második TOF egységben megy végbe. A kvadrupól tömegspektrométer (**7.c ábra**) az ionokat a négy elektród között időben változó elektromos tér által választja szét, azaz csak az adott elektromos térben stabil röppályával rendelkező m/z ionok jutnak át. A lineáris ioncsapda (tripla kvadrupól) első szakaszában (Q_1) kiválasztott ionok a második egységben, az ütközési cellában fragmentálódnak (q_2), majd a keletkezett fragmens ionok elválasztása az utolsó egységben (Q_3 , piros ponttal jelölve) történik. A kvadrupól (Q_3) egységben befogott ionok elektromos rezgőkörrel gerjesztődnek, majd a szkennelésük során képződik a tandem MS spektrum. A tripla kvadrupól többféle pásztázási módot tesz lehetővé: tömegspektrum szkennelés (mass spectrum scan) mellett anyaion szkennelés (prekursor ion szkennelés), leányion szkennelés (product, fragment, vagy daughter ion scan), semleges-vesztés szkennelés (neutral loss scan). Emellett alkalmas szelektív ion-monitoring [Multiple Reaction Monitoring (MRM), vagy selected reaction monitoring] (5,8) módszerre is, ami ugyancsak jelentős mértékű szelektivitást kölcsönöz ennek a technikának. Továbbá a tripla kvadrupól esetében van egy q_0 ütközéses fókuszálási cella, amelynek feladata az összes keletkezett ion továbbítása és fókuszálása a tömegspektrométer első kvadrupól egységébe (Q_1). A kvadrupól-TOF [Q-TOF] (**7.d ábra**) tömegspektrométerben a tömegmérés egy tripla kvadrupól és egy reflektor TOF egyesítésével keletkezett készülékben történik, ahol a Q_3 helyett egy reflektor TOF analízátort építettek be. A **7.e ábrán** egy háromdimenziós ioncsapda (ion trap) fogja be az ionokat, majd az adott elektromos térnek megfelelő m/z tömegű ionokat engedi át a detektorba (LC-MS), illetve egy adott m/z iont összegyűjtve, annak fragmentálódását követően történik a keletkező fragmens ionok vizsgálata (LC-MS/MS). Az előzőektől eltérően ez időben összekapcsolt tandem tömegspektrométer. Az FT-ICR MS készülék (**7.f ábra**) szintén csapdázza az ionokat, de erős mágneses tér alkalmazása mellett. Az ábra a hatásos izolálás érdekében alkalmazott FT-ICR MS és lineáris ioncsapda egyesítésével készült tandem tömegspektrométert mutatja, ahol az ion fragmentálása és vizsgálata az FT-ICR MS egységben történik. (10)



7. ábra A proteomikában alkalmazott tömegspektrométerek különböző konfigurációi a rájuk jellemző ionforrással. a, reflektoron TOF készülék **b,** TOF-TOF készülék. **c,** tripla kvadrupól tömegspektrométer **d,** kvadrupól-TOF [Q-TOF] tömegspektrométer **e,** A háromdimenziós ioncsapda (ion trap) **f,** FT-ICR MS készülék (10)

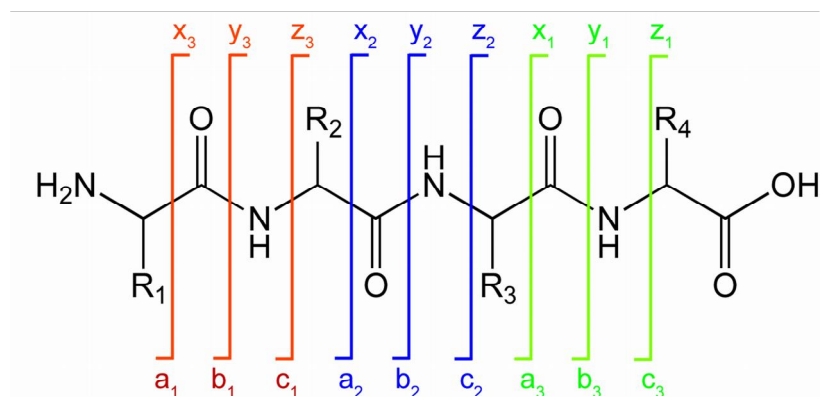
A tömegspektrometrián alapuló fehérjeazonosítást és jellemzést, valamint a kvantitatív meghatározást egyesek a proteomika szűkebb részének tekintik és egyúttal azokat a kutatásokat, amelyekben meghatározó szerepe van a tömegspektrometriának, eléggé önkényes módon 5 fő csoportra osztják (22):

1. fehérjeazonosítás
2. fehérjék (relatív vagy abszolút) kvantitatív analízise
3. fehérje-fehérje kölcsönhatások tanulmányozása
4. poszt-transzlációs módosítások vizsgálata
5. strukturális proteomika

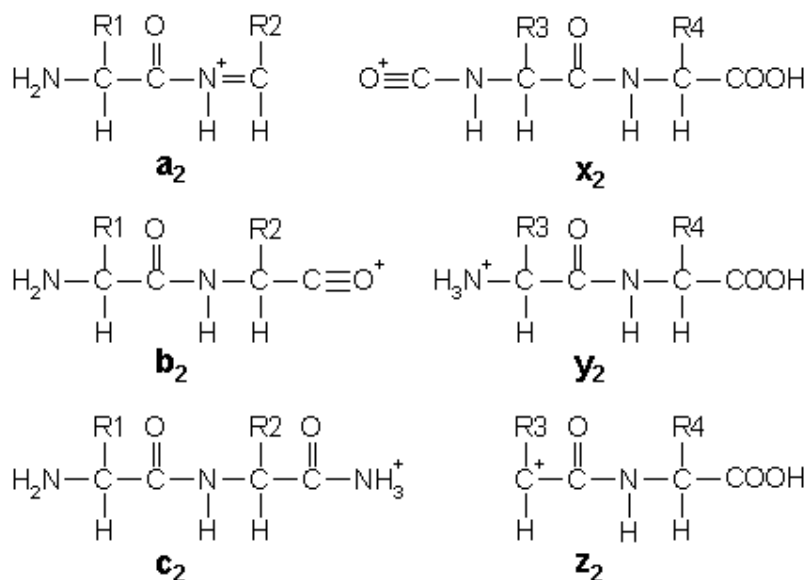
Az alábbiakban a proteomika (fenti csoportosításnak megfelelő) területei közül azokat tárgyalom röviden, amelyek a munkámmal kapcsolatban állnak: fehérjeazonosítás (1,23), fehérjék kvantitatív analízise (24) és poszt-transzlációs módosítások tanulmányozása.

Fehérjeazonosítás: A MALDI-TOF tömegspektrométer pontossága, érzékenysége, felbontása és egyszerűsége révén előszeretettel alkalmazott módszer fehérjék azonosítására. A fehérjeminták tömegspektrometriás vizsgálata azok enzimatis, vagy kémiai úton történő emésztése során keletkező peptidek molekulahúly meghatározásán alapul. Egy meghatározott specificitású enzim hasítási termékeinek együttese jellemző az adott fehérjére. A peptidek a

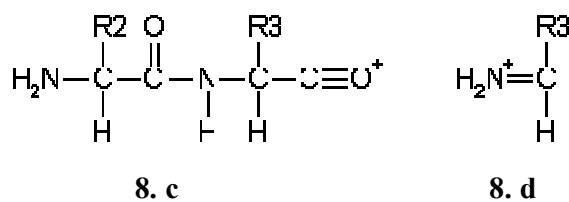
fehérje „ujjlenyomatát” képezik, azaz az adatbázisban szereplő fehérje adott enzimmel történő „*in silico*” emésztése során kapott peptidek tömegére illenek, így meghatározva azt. Az ujjlenyomat manapság már bűntények esetén sem elegendő bizonyíték. A proteinek csupán peptidtömegeik alapján történő azonosítása sem elég a mintában lévő fehérje nagy biztonsággal történő azonosításához (különösen többkomponensű minták esetében). Mivel a MALDI és ESI MS csak tömeginformációt ad, ugyanakkor egy tömeghez egyszerre több szekvencia is megfeleltethető, a fehérjéhez rendelhető peptid, vagy peptidek szekvencia információjára van szükség, amit a fragmentációs spektrumok (MS/MS) felvétele szolgáltat. Az utóbbi eljárás akár önmagában is alkalmas egyes fehérjék azonosítására. A peptidfragmentáció első nevezéktanát P. Roepstorff (1984) teremtette meg, amit Johnson és munkatársai továbbfejlesztettek (1987) (25). Az általánosan elfogadott nevezéktan (**8. ábra**) Klaus Biemann névéhez fűződik, akit egyben a szerves/biokémiai tömegspektrometria atyjának is neveznek. A **8.a, ábrán** a fragmentációs spektrumok esetében megfigyelhető lehetséges fragmensek láthatóak, amelyek számos faktortól függően, mint pl., elsődleges szekvencia, belsőenergia, töltés, fragmentálás módja (pl., PSD, CID, ETD) detektálhatók. Amennyiben a töltés az N-terminális felőli darabon marad, az ionok a peptidkötés hasadási helyétől függően a, b, c, fragmensek lehetnek. Ha a töltés a C-terminális darabon lokalizálódik, x, y, z fragmensek képződnek. Az alsó indexek a **8.a ábrán** a hasított aminosavnak a megfelelő terminálistól számított távolságát jelzik. A lehetséges hat egyszeresen töltött fragmens ion szerkezetét a **8.b ábra** mutatja. A peptid vázának kétszeres hasadása további ion, a belső fragmens ion képződéséhez vezet (**8.c ábra**). A fragmentációs spektrumokban ugyancsak megjelenhet a peptidet felépítő aminosavakból származó ion, az immónium ion (**8.d ábra**), melynek detektálása az adott aminosav jelenlétére utal.



8. a

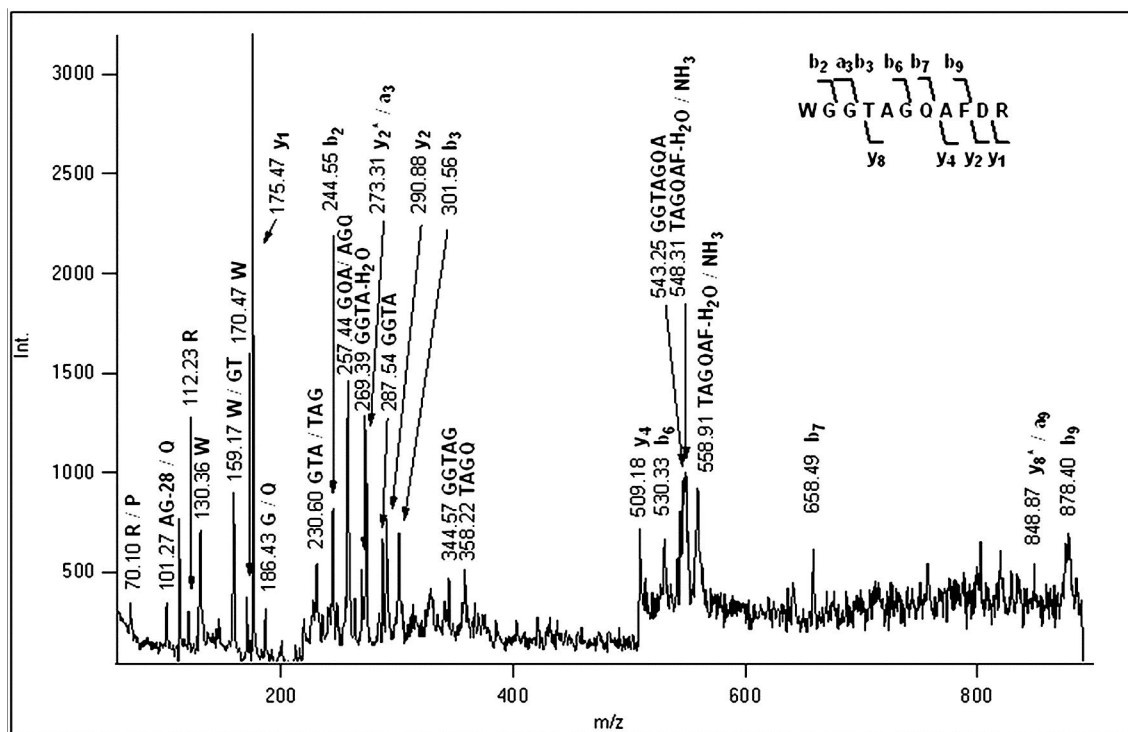


8.b



8. ábra Protonált peptid fragmentációja. **8.a,** Az MS/MS spektrumok esetében megfigyelhető lehetséges fragmensek: a, b, c, fragmensek, amennyiben a töltés az N-terminális felőli darabon marad, illetve x, y, z fragmensek, ha a töltés a C-terminális darabon lokalizálódik. Az alsó index a hasított aminosavnak a megfelelő terminálistól számított távolságát jelzi. **8.b,** A hat egyszeresen töltött fragmens ion szerkezete. **8.c,** Egy belső fragmens szerkezete **8.d,** Immónium ion.

A 9. ábra a munkám során azonosított *Streptomyces griseus* aminopeptidase (1) megerősítő fragmentációs (PSD) spektrumát mutatja be szemléltetésként.



9. ábra *Streptomyces griseus* aminopeptidase $MH^+ = 1165.54$ tömegű peptidjéről felvett MALDI-TOF PSD spektrum, amely a fehérje WGGTAGQAFDR [279-289] szekvenciájának felel meg.

A fehérjekeverék proteolitikus emésztményének (leggyakrabban triptikus) LC-MS/MS analízissel történő vizsgálatát, amely során számos fragmentációs spektrum felvételére van lehetőség, „Shotgun Proteomics”-nak nevezik. A fehérjék azonosítása a mérés során készült MS/MS spektrumok adatbázisban történő lekeresésén alapul. Az adatbázis lekeresés során először a mintában lévő peptideket fragmentációs spektrumuk alapján egymástól függetlenül egyenként azonosítjuk, majd ezt követően történik a peptidek hozzárendelése a fehérjékhez.

A vizsgált fehérjék azonosítása során azonban több probléma is felmerülhet: **a**, hibás, vagy hiányos az adatbázis (pl., *Triticum aestivum*/búza, *Streptomyces griseus*) (1); **b**, izoformák, variánsok lehetnek a mintában; **c**, nem-specifikus hasítások, kovalens módosítások következnek be a minta-előkészítés során.

Amennyiben egy adott fajra nézve hiányos az adatbázis, még kaphatunk elfogadható eredményt a lekeresések során, ha a fehérje tartalmaz konzervált szekvencia szakaszokat és az adatbázis-lekeresés egy másik faj megfelelő homológ proteinjét határozza meg találatként.

Konzervált szekvencia szakaszok híján – és tömegspektrometriás szempontból egyetlen aminosav cseréje is komplikációt okoz – nem tudjuk a fehérjét azonosítani. Másik célravezető megoldás lehet a „*de novo*” szekvenálása az MS/MS spektrumoknak, amennyiben azok megfelelő minőségűek. A meghatározott szekvenciát figyelembe véve tovább vizsgálódhatunk különböző elérhető eszközök bevetésével (pl., Protein Prospector: MS-homology, MS Pattern; BLAST stb). Egy *Streptomyces griseus* minta vizsgálatának „buktatói” szemléltetesként a mellékletben találhatók. További nehezítő tényezők lehetnek az izoformák, variánsok, mivel ezek szekvenciája nem azonos és az eltérés más peptid molekulásúly térképet, illetve fragmentációs spektrumot eredményezhet. Ez szintén megtévesztheti/félrevezheti az adatbázis-lekereséseket. Ugyanakkor előnyünkre is szolgálhat, lásd fentiekben. Végül a nem-specifikus hasítások, kovalens módosítások (cisztein nem várt akrilamidálódása a gélben, metioninok nagymértékű oxidációja) következtében megjelenő újabb tömeggel rendelkező peptidok is bonyolíthatják az analízist. Példaként említeném több analizált mintában az Asp és Glu aminosavak karboxil-csoportjainak jelentős mértékű metilésztereződését, amire az emésztést megelőzően a gélben történő festés során tettek szert egy mellékreakció eredményeként (1,26). Ezek szintén jelentős mértékben megnövelték a detektált komponensek számát a tömegspektumban.(5,8)

Fehérjék (relatív vagy abszolút) *kvantitatív analízise*: Minden új módszernél először elegendő a minták minőségi jellemzése, de egy idő után szinte minden esetben igény lép fel a számszerűsítésre is. A kvantitatív vizsgálatok elengedhetetlenek a biológiai folyamatok megértésében. Két, vagy több minta összehasonlításából kapott eredmények (különbségek) összefüggésben lehetnek fejlődési állapottal, gyógyszeres kezeléssel, betegséggel, vagy a sejtciklus állapotával stb. Testfolyadék (plazma, szérum, vizelet), szövet, vagy akár sejtek egyaránt lehetnek a vizsgálat tárgyai. A kutatások egyik fő célja a betegségek biomarkerének/einek meghatározása. Az egyre jobban fejlődő MS technikák lehetővé tesznek olyan kvantitatív vizsgálatokat, ahol a gyógyszer-target keresésére és jelátviteli folyamatok követésére irányuló proteomikai alkalmazások a fehérje relatív mennyiségének mérésén alapulnak. Sokféle kísérletben a mennyiségi meghatározásra a komponensek relatív intenzitásából vonnak le következtetéseket. A mintában lévő komponens mennyisége és az ion, illetve ionáram intenzitása között nincs egyértelmű összefüggés. Egy adott komponenshez tartozó mért jel intenzitását nagyon sok tényező befolyásolja, befolyásolhatja (szerkezet, hidrofóbicitás, bázicitás, töltés stb.), nem utolsósorban pedig a mintában jelenlevő összes többi komponens. Ezért a tömegspektrometria alapvetően nem kvantitatív módszer, de megfelelő trükkökkel azzá tehető. A tömegspektrometriás mennyiségi meghatározásokhoz

további technikák kifejlesztésére volt és van még ma is szükség a minél megbízhatóbb és reprodukálhatóbb eredmények elérése érdekében. A kvantitatív tömegspektrometriás mérések során bevett eljárás, hogy a vizsgált molekula jelintenzitását egy ismert mennyiségben jelenlévő „standard” molekula jelintenzitásához viszonyítják. Amennyiben rendelkezünk kalibrációs görbével, amely a két molekula jelintenzitásait azok koncentráció-arányainak függvényében ábrázolja, úgy arról a mintában észlelt intenzitás-arányhoz tartozó koncentráció-arány is leolvasható. Ennek az eljárásnak feltétele, hogy a jelintenzitást befolyásoló tényezők (ld. feljebb) azonos mértékben hassanak a két molekulára. E feltétel teljesítésére gyakran a meghatározandó komponens valamilyen analógját (strukturális, funkcionális, vagy hasonló bázicitású és hidrofóbicitású molekula), illetve stabil izotóppal jelölt analógját használják standardizálásra. Több stabil izotópos jelölésen alapuló módszert kidolgoztak már mennyiségi meghatározásokhoz: izotóposan jelölt affinitás tag-ek (isotope-coded affinity tags, **ICAT**), stabil izotóppal történő jelölés stabil izotópot tartalmazó sejt kultúra felhasználásával (stable isotope labeling with amino acids in cell culture, **SILAC**), lehasítható izotóposan jelölt affinitás tag-ek (cleavable isotope-coded affinity tags, **cICAT**), relatív és abszolút kvantifikáláshoz való izobár tag-ek (isobaric tags for relative and absolute quantification, **iTRAQ**) (9,10,16,27-31), ^{18}O (32-34) és AQUA (Absolute Quantification of Abundance) (35) standardok. Az izotópos-jelölés történhet anyagcsere folyamatra épülő módszerrel, enzimatis (pl., tripszines emésztés H_2O^{18} jelenlétében), vagy kémiai úton (9). Munkám során a kvantitatív vizsgálatok csak nagyon kis szeletével, frakcionálatlan elegyek MALDI-alapú mennyiségi meghatározásának tanulmányozásával foglalkoztam. A MALDI-TOF előnyös tulajdonságai miatt előszeretettel alkalmazott fehérjeanalitikai módszer, ugyanakkor számos sajátossága (lásd 2. Fejezet, Elméleti áttekintés) jelentős mértékben megnehezíti kvantitatív mérésekben történő alkalmazását.

Poszt-transzlációs módosítások tanulmányozása: A poszt-transzlációs módosítások jelenléte a genomból mai tudásunk alapján nem megjósolható. Az irodalomban közel 500 poszt-transzlációs módosítás ismert [UniMod, <http://www.unimod.org> (531), illetve **RESID**, <http://www.ebi.ac.uk/RESID/> (428), **Delta Mass**, <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>. (351)] (36) magában foglalva a kémiai módosításokat is, ugyanakkor ezek átfedhetnek, mivel egyesek mind biológiai, mind kémiai folyamat következtében is bekövetkezhetnek. Christopher T. Walsh a proteinek poszt-transzlációs módosításairól szóló részletes összefoglalója a közelmúltban jelent meg (37). Poszt-transzlációs módosítások például a diszulfid-hidak, az oxidáció, az acetilezés, a metilezés, a foszforiláció, a szulfatálás, a glikoziláció, a keresztkötések és az ubiquitinálás. A módosítások a fehérjék fizikai

tulajdonságainak és biológiai sajátságának a megváltozásával járnak. A poszt-transzlációs módosítások faj-, szövet-, sejten belüli lokalizáció, állapot-, kor-, vagy kórkép-függőek lehetnek. Beszélhetünk dinamikus, vagy állandó, illetve a módosítás mértéke alapján nagyfokú és kisfokú módosításokról. Sok kovalens módosítás a fehérjepopulációnak csak egy részét, gyakran csak nagyon kis töredékét érinti (<néhány %).

A PTM-ek tanulmányozásánál tehát több nehezítő tényező is felléphet. Mivel a kovalens módosítások a fizikai tulajdonságok megváltozásával is járhatnak: valamilyen mértékben módosulhatnak a peptid kromatográfiás tulajdonságai, MS viselkedése, azaz detektálhatósága, fragmentálódási tulajdonságai, ezért minden esetben más módszer, esetleg módszerek vezethetnek eredményes analízisükhöz. Másrészt annak a problémának a megoldására, hogy a módosítások csak minimális mértékben fordulhatnak elő, az MS analízist megelőzően az adott módosításra kidolgozott dúsítási eljárást (ha van ilyen) célszerű alkalmazni, hogy a módosított peptideket detektálhassuk. A fentiekből egyértelműen kitűnik, hogy a poszt-transzlációs módosítások vizsgálatánál szisztematikusan felépített, megtervezett kísérletre, kísérletsorozatra van szükség.

Munkám során bizonyos fehérjék ubiquitinálásának tanulmányozásával foglalkoztam. A módosított peptid dúsítására (peptid szinten) egyelőre nincs megfelelő eljárás, ezért másfajta megoldásokat kellett keresnünk (lásd 3. Fejezet, Kísérleti rész/Eredmények).

Ph.D. értekezésemben az egyes fehérjék vizsgálatával és azonosításával kapcsolatos munkák eredményeit a terjedelmi korlátok miatt nem fejtem ki részletesen (a mellékletben, a csatolt cikkben megtalálhatóak). Ugyanakkor részletesen tárgyalom a MALDI-TOF tömegspektrumokban fellépő szuppressziós jelenség vizsgálatával kapcsolatos eredményeket és a MALDI-TOF kvantitatív jellegének és felhasználhatóságának tanulmányozását, illetve egy poszt-transzlációs módosítás (ubiquitinálás) vizsgálatát. Az egyes témákhoz tartató célkitűzések a következők voltak:

I. **Fehérjeazonosítás:**

- Marha agyszövetből izolált tubulin polimerizációját elősegítő fehérje (TPPP/p25) kölcsönható partnereinek azonosítása MALDI-TOF tömegspektrometriával.
- A vad típusú *Streptomyces griseus* (gram-pozitív baktérium) törzs (B2682), az A-faktort nem termelő AFN jelű törzs és az AFN mutáns transzformánsának, azaz az AFN/pSGF4 transzformáns fehérje expressziójának vizsgálata. Az

AFN/pSGF4 transzformánsban C-faktor szignál proteint/molekulát (Signaling Protein Factor C) expresszáltattak pSGF4 plazmidről. A projekt során a feladatom ezen törzsek fehérjeprofíljában különbséget mutató fehérjék tömegspektrometriás analízise volt.

II. ***Fehérjék kvantitatív analízise:***

Munkám során az egyik fő feladatom a MALDI-TOF tömegspektrometria kvantitatív felhasználhatóságának a vizsgálata, a kvantitatív mérések megbízhatóságának a tanulmányozása volt. A vizsgálatok/mérések eltérő összetételű rendszerek felhasználásával történtek. Célunk volt egy, a mennyiségi meghatározások során kapott eredmények pontosságát és megbízhatóságát jellemző statisztikai analízis kidolgozása is.

III. ***Poszt-transzlációs módosítások tanulmányozása:***

A következő fehérjék esetében az ubiquitinálás tényének bizonyítása és a módosítás helyének pontos meghatározása volt a cél: humán DNS polimeráz α , DNS polimeráz β , Werner helicase interacting protein (ATPase WRNIP1, és élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) Rad5 protein.

2. MALDI-TOF MS kvantitatív jellegének tanulmányozása

2.1. Elméleti áttekintés

Munkám során az egyik fő feladatomban a MALDI-TOF tömegspektrometria kvantitatív felhasználhatóságának vizsgálata, a kvantitatív mérések megbízhatóságának tanulmányozása volt. (24)

A MALDI-TOF MS széles körben alkalmazott analitikai eljárás kiváló érzékenysége, viszonylag kis időigénye és egyszerűsége miatt. Mivel nagyrészt csak egyszeresen töltött ionok jelennek meg a tömegspektrumban (3,38), ezért a MALDI spektrumok kiválóan alkalmasak lehetnek keverékek analízisére. Rendszeresen alkalmazzák proteomikai tanulmányokhoz (13,39), gyakran a minta előfrakcionálása nélkül (40), illetve sejteken és szövetekben is kvalitatív és kvantitatív analízisre egyaránt. Az utóbbi időben a MALDI-TOF MS előszeretettel használt módszer különböző típusú mintákból származó biomolekulák (oligonukleotidok, proteinek, glikoproteinek stb.) kvantitatív analízisére (34,41-75), vagy akár szövetminták feltérképezésére (61-66,76-90) is. Ugyanakkor számos közlemény tárgyalja a MALDI-TOF MS nem kvantitatív jellegét (46,49,61,67,75,90-94), az elegyek MALDI-MS vizsgálatainál fellépő szuppressziós jelenségeket, a MALDI-TOF MS mérések diszkriminatív tulajdonságait, amelyek megnehezítik, illetve hátráltatják ennek a módszernek a mennyiségi meghatározások során való alkalmazását. A fő problémát a MALDI gyenge reprodukálhatósága okozza, amely a legtöbb mérés során elég körülményessé teszi a vizsgálatokat (67,91,95). Ez különösen igaz komplex minták esetében. Az alacsony reprodukálhatóság kétféleképpen is érthető: azonos mintából két különböző target pozícióban (sample-to-sample), vagy adott mintából két egymást követő lézer-impulzus hatására (shot-to-shot) térnek el az eredmények. Az úgynevezett „csúcs-pont” (hot spot, vagy sweet spot) jelenség (96) a fő oka a MALDI gyenge reprodukálhatóságnak: a minta-mátrix kristályhalmazban akad egy vagy több pont, ahová célozva a lézersugárral intenzív tömegspektrometriás jelet kapunk, esetleg csakis onnan vagyunk képesek ionokat produkálni. Meglelni ezeket a pontokat nem triviális, ennek következtében jelentős mértékben megnő a mérésidő és komplikálttá válik az analízis automatizálása. Továbbá ez az a faktor, amely gátolja a MALDI MS képalkotó eljárásokhoz való felhasználását (91). A „csúcs-pont” jelenség oka nem teljesen egyértelmű, a mátrix eltérő mennyisége és/vagy különböző

kristályosodása okozhatja (91). Ez utóbbi a minta lokális koncentrációjának is a függvénye. A mátrix-minta kristályok spektrométer tengelyéhez viszonyított helyzetétől szintén függhet a jelek intenzitása (91). A „csúcs-pont” jelenség mértéke jelentősen függ az alkalmazott mátrixtól. A CHCA alkalmazása a minta viszonylag homogén kristályosodását eredményezi (91), ezért is használják gyakran, illetve használtuk mi is ezt a mátrixot kísérleteink során. Ugyanakkor több esetben a homogén mintapreparálás ellenére a relatív intenzitás és koncentráció között drasztikus nem lineáris korrelációt tapasztaltak (97,98). A gyenge reprodukálhatóság javítására, illetve kiküszöbölésére irányuló legáltalánosabb próbálkozások a belső standardok használata (34,43,45,49,51,52,55-57,59,67,68,70,73,75,99-101), azonban ezeknek az alkalmazását számos faktor akadályozza, illetve akadályozhatja (67) (lásd bővebben az Eredmények tárgyalása és diszkusszió részben). A legjobb megoldásnak a stabil izotóppal jelölt analógok belső standardként való felhasználása látszik.

A másik faktor, ami gátolja a MALDI kvantitatív mérésekhez való alkalmazhatóságát, az a szuppresszió jelensége, amelyet szintén számos publikációban tárgyaltak már (67,93,94,97,98,102-104). Ez magában foglalja a mátrix szuppresszió hatását (Matrix Suppression Effect, MSE), a mátrix szuppressziós és mátrix-ion interkonverziós reakciók (Matrix Suppression and Matrix Ion Interconversion Reactions) és a minta szuppressziós hatását (Analyte Suppression Effect, ASE) (93). A szuppresszió különösen az olyan komplex biológiai minták analízise során torzíja el az adatokat, amelyekben jelenlévő különböző komponensek koncentrációja jelentős mértékben eltér, széles koncentráció tartományt átfedve, illetve azok ionizációs hatékonysága is nagymértékben különbözik.

A MALDI további hátrányai közé tartozik limitált dinamikus tartománya, amit a tömegspektrométer detektorának telítődése határoz meg. A lézererősség ingadozása szintén hozzájárul a minta jelintenzitásainak változékonyságához. Végül az azonos, illetve hasonló tömegű komponensek csúcsainak átfedése is torzíthatja az adatokat (46,49,70,75,105).

Utóbbi időben már számos, a detektált jelek intenzitásainak változékonyságát befolyásoló faktort vesznek figyelembe (74,93,103,106-113), mint például a peptidek hidrofóbicitását, bázicitását, az alkalmazott mátrixot, a minta különböző komponenseinek mennyiségét, vagy az elegy komplexitását. Több esetben beszámoltak a nagyobb hidrofóbicitású és bázicitású peptidek könnyebb detektálhatóságáról (103,114-116). Mátrix-ko-mátrix rendszerek alkalmazása (70,101,107,117-120), „szendvics” (121), vagy más kifejlesztett preparálási eljárások (3,122-124) révén is számos biztató eredményt bemutattak már. A minta detektálhatóságának javítása és a kvantitatív mérésekhez megfelelő, illetve kellő pontossággal bíró kalibrációs egyenes fejlesztésének érdekében egykomponensű, oldószermentes (50,92) és

ionos folyadékmátrixokat (ionic liquid matrix, ILM) vagy más néven szobahőmérsékletű ionos folyadékokat/oldószereket (room-temperature ionic liquids, RTIL) (45,46,58,91,125,126) felhasználó mintapreparálási eljárásokat fejlesztettek ki. Vannak arra vonatkozó feltételezések, hogy a mintában lévő komponensek karaktere (fehérje, peptidek) szintén befolyásolja azok detektálhatóságát (127). Egyelőre azonban a MALDI „teória” és „modell” még elég távol áll attól, hogy jóslásokat lehessen tenni (128) a komponensek detektálhatóságát illetően. Az utóbbi időben számos publikáció látott napvilágot, amelyben a MALDI mechanizmusát taglaló elméletek továbbfejlesztését tárgyalták (38,93,109,112,128-144) annak érdekében, hogy az ionképződés mélyebb megértése révén és az új ismeretek felhasználásával a MALDI reprodukálhatóságának növelését és alkalmazhatóságának kibővítését segítsék elő. A legújabb elképzelést az energia-transzfer- indukált diszproporciós modell (energy-transfer-induced disproportionation, ETID) írja le, amely figyelembe veszi a MALDI mintapreparálás során a kristályosodás folyamán fellépő pszeudo-protontranszfert (135). Egy másik tanulmány a végleges spektrum, azaz a detektált jelek meghatározásában a gázfelhőben lejátszódó szekunder reakcióknak tulajdonít domináns szerepet (93,108,128).

2.2. Célkitűzés

Számos biológiai mintában nemcsak a komponensek kimutatása lenne a cél, hanem azok mennyiségi meghatározása is. Az utóbbi időben előszeretettel használja számos csoport a MALDI-TOF tömegspektrometriát is kvantitatív mérésekhez. Emellett számos publikáció tárgyalta már ennek a módszernek a nem kvantitatív jellegét. A mi korábbi tapasztalataink is arra utaltak, hogy ezek a kvantitatív vizsgálatok megalapozatlanok. Ezért az volt a célunk, hogy szisztematikusan felépített kísérletekkel és a mérési adatok megfelelő statisztikai analízisével feloldjuk ezt az ellentmondást, vagy megerősítsük korábbi gyanúinkat. Egyrészt arra voltunk kíváncsiak, hogy az a relatív intenzitás, amit adott összetétel mellett látunk, mennyire reprodukálható. Másrészt tudni akartuk, hogy minden körülmény (eltérő mintaösszetétel) között is jól detektálhatóak-e az adott fehérjére jellemző peptid, illetve peptidek jelei, és ugyanazt a relatív intenzitás eloszlást kapjuk-e. Továbbá azt is ki akartuk deríteni, hogy mennyire megbízhatók a különböző külső vagy belső standardok segítségével felállított kalibrációs görbék, és milyen koncentráció tartományban használhatók.

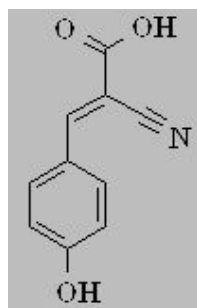
Kutatásaink során először egyedi mintasorozatokat vizsgáltunk különböző mintapreparálást követően. A későbbiekben pedig eltérő komplexitású mintasorozatokat

tanulmányoztunk. A sorozat-méréseket követően a kapott adatok statisztikai analízisét is elvégeztük.

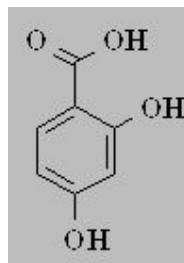
2.3. Kísérleti rész

2.3.1. Vegyszerek és felhasznált anyagok

Az Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) által forgalmazott α -ciano-4-hidroxifahéjsav (CHCA) (**10. ábra**) 60% metanol/30% H₂O/0.3% hangyasav oldata. A Scharlau által forgalmazott HPLC tisztaságú acetonitril (ACN). A Sigma-Aldrich társaságtól (Németország) rendelt 2,5-dihidroxibenzoésav (DHB) (**10.b ábra**) telített vizes oldata. Ugyancsak a Sigma által forgalmazott Angiotensin II ($MH^+ = 1046.54$ Da), α MSH ($MH^+ = 1664.80$), ACTH (18-39), ($MH^+ = 2465.20$) és a marha inzulin B-lánc ($MH^+ = 3494.7$) standard peptidek a műszer kalibrációjához.



10.a



10.b

10. ábra A MALDI-TOF mérések során alkalmazott mátrixok, **10.a** α -ciano-4-hidroxifahéjsav, **10.b** 2,5-dihidroxibenzoésav

Marha szérum albumin (BSA), és marha fetuin triptikus emésztményét (Fet) (laboratóriumunkban készítve), N-terminálison eltérő bázicitású szintetikus peptideket (C. Turck ajándéka) (**1. táblázat**) és citokróm C egy peptidjét és ennek stabil-izotóppal jelölt változatát (**1. táblázat**) (Thermo, Heavy Peptide™ AQUA Demo Kit, Cat. # 300100, Lot # 0703_05, izotóp kompozíció: Leu*-¹³C₆, 98%; ¹⁵N, 98%, P* peptid) használtam fel különböző összetételű komplex minták elkészítéséhez. A szintetikus peptidek törzsadatainak pontos koncentráció-meghatározása aminosav-analízissel történt. A friss *Escherichia coli* sejtenyészet preparálása a Szegedi Biológia Központ Biokémiai Intézetében történt Dr. Pósfai György laboratóriumában.

A munkák során alkalmazott gélöltő (gel loading) pipettahegy és a szilikonizált, alacsony fehérjekötő mikrocentrifuga csövek a Costar (prelubricated tube, Corning, NY USA), vagy az Eppendorf AG (Protein LoBind tube, Hamburg, Germany) cégtől származtak.

peptid	szekvencia	MH ⁺
Arg-peptid	RTAYSQSAY	1046.49
Lys-peptid	KTAYSQSAY	1018.48
His-peptid	HTAYSQSAY	1027.45
Leu-peptid	LTAYSQSAY	1003.47
P	TGPNLHGLFGR	1168.62
P*	TGPNL*HGLFGR	1175.64

1. táblázat Az eltérő komplexitású mintákhoz felhasznált N-terminálison különböző bázicitású aminosavakat tartalmazó peptidek és a stabil izotópot alkalmazó vizsgálatokhoz felhasznált peptidek, a monoizotópos tömegekkel (MH⁺) feltüntetve.

2.3.2. Mintaelőkészítés

A szuppresszió és az egyedi méréssorozatok linearitásának vizsgálatára több mintasorozatot készítettünk el fetuin és/vagy BSA triptikus emésztményéből ismert mennyiségű szintetikus peptid hozzáadásával (**2. táblázat**). Azért, hogy megvizsgáljuk a kristályosodás sebességének hatását a mérési eredményekre, a minták beszárítása először külön beavatkozás nélkül történt, a későbbiekben pedig vákuum alkalmazásával.

A MALDI-TOF kvantitatív alkalmazhatóságának vizsgálatára fetuin és/vagy BSA triptikus emésztményt adott mennyiségű, N-terminálison eltérő bázicitású szintetikus peptidekkel összekeverve különböző komplexitású mintasorozatokat készítettem (**3. táblázat**). A

különböző összetételű mintákat kétszer készítettem el és mindegyiket 5-ször vittem fel a MALDI-targetre, így összesen tíz-tíz mérés állt rendelkezésre a reprodukálhatóság vizsgálatára. A frissen tenyésztett *Escherichia coli* sejt-szuszenziót háromszori ülepités és újrassuszenzáálás után használtam fel. A mintákból 1 µl, a mátrixból 0.5 µl mennyiséget vittem fel a targetre „dried-droplet” módszerrel (124) CHCA, vagy DHB mátrix, vagy ezek keverékeinek alkalmazásával.

„dried-droplet” módszer (124) lépései:

1. minta targetre vitele
2. mátrix felvitele
3. az elegy beszárítása szobahőmérsékleten

növekvő mennyiségű komponensek állandó mennyiségű komponensek	Arg-peptid	Lys-peptid	His-peptid	Leu-peptid	BSA emésztmény	Arg- és Leu-peptid
100 fmol fetuin emésztmény ^V	DHB, CHCA, DHB CHCA =1:2 és 2:1					
100 fmol BSA emésztmény ^V	DHB, CHCA, DHB:CHCA=1:2 DHB:CHCA=2:1	NM	DHB, CHCA DHB:CHCA=1:2 DHB:CHCA=2:1			
100 fmol fetuin emésztmény	DHB/ CHCA /DHB:CHCA =1:2 és 2:1				CHCA	CHCA
100 fmol BSA emésztmény	DHB, CHCA, DHB:CHCA=1:2 DHB:CHCA=2:1	NM	DHB, CHCA DHB:CHCA=1:2 DHB:CHCA=2:1			
500 fmol fetuin emésztmény	CHCA					
500 fmol BSA emésztmény	CHCA	NM	CHCA			
100 fmol fetuin emésztmény 500 fmol BSA emésztmény						
100 fmol fetuin emésztmény 100 fmol Arg-peptid				CHCA		
100 fmol fetuin emésztmény 2×10⁶ cfu E. coli	CHCA	CHCA	CHCA	CHCA		CHCA

2. táblázat A felhasznált minták összetétele és az egyes mérések során alkalmazott mátrix. A fetuin és/vagy a BSA emésztmény mennyisége állandó volt, míg a szintetikus peptidek mennyisége 50 fmolról 1 pmolig növekedett. A harmadik sorban szereplő mintáknál, állandó mennyiségű fetuin emésztmény mellett a BSA emésztmény mennyisége változott, a BSA növekedés tartománya 50-500 fmol volt.

^V A minták szárítása vákuum alkalmazásával történt.

^{NM} A Lys-peptid és egy triptikus BSA peptid azonos nominális tömege miatt nem volt érdemes ezt az elegyet analízálni.

cfu (colony forming unit): telepképző egység.

<div> <div>növekvő mennyiségű komponensek</div> <div>állandó mennyiségű komponensek</div> </div>	Arg-peptid	Leu-peptid	Arg- és Leu-peptid	P
100 fmol fetuin emésztmény	+	+	+	
100 fmol fetuin emésztmény, Arg-peptid		+		
100 fmol fetuin emésztmény 2×10⁶ cfu <i>E. coli</i>	+	+	+	
100 fmol fetuin emésztmény Arg-peptid 2×10⁶ cfu <i>E. coli</i>		+		
100 fmol fetuin emésztmény 100 fmol P*				+
100 fmol fetuin emésztmény 100 fmol P* 2×10⁶ cfu <i>E. coli</i>				+

3. táblázat A MALDI-TOF kvantitatív jellegének vizsgálatánál alkalmazott minták. A fetuin emésztmény, az Arg-peptid, vagy P* peptid és az *Escherichia coli* sejt-szuszpenzió állandó mennyisége mellett a hozzáadott szintetikus peptid mennyisége 50 fmolról 1 pmólra növekedett. Minden egyes mérés során az alkalmazott mátrix CHCA volt. cfu: telepképző egység.

2.3.3. A tömegspektrometriás mérések kivitelezése

A mérésekhez a laboratóriumban rendelkezésre álló SCOUT 384 ionforrással és pulzáló nitrogén lézerrel (337nm) felszerelt Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométert (Bruker Daltonics, Karlsruhe, Germany) használtuk. A spektrumok felvétele késleltetett extrakció (200ns) (**4. ábra**) és iontükör ("reflectron" mód) (**3. ábra**) alkalmazásával, pozitív ionmódban történt. A "matrix suppressor"-t (matrix deflection high voltage, mátrix eltérítő nagyfeszültség) minden esetben $m/z = 800$ -ra, a felső tömegtartományt $m/z = 4000$ értékre állítottuk be. A MALDI-TOF tömegspektrométer működési paramétereit: ionforrás 1: 20 kV, ionforrás 2: 16.3 kV, lencsék: 9.5 kV, iontükör: 23 kV, detektor: 1710 V.

A készülék kalibrálása Angiotensin II ($MH^+ = 1046.54$ Da), α MSH ($MH^+ = 1664.80$), ACTH (18-39), ($MH^+ = 2465.20$) és a marha inzulin B-lánc ($MH^+ = 3494.7$) standard peptidek felhasználásával, azok monoizotópos tömegeivel történt. A méréseket manuálisan végeztem: 1000 lézerlövés eredményét összegeztem, a minta egész területét „végigjárva”. A mérések során a spektrumok minőségét folyamatosan ellenőriztem és a telített, vagy kis intenzitású (<1200) csúcsokból álló spektrumokat elvettem. A manuális ellenőrzésre azért volt szükség,

mert az automata adatgyűjtő programok általában nem tesznek lehetővé ilyesfajta minőségellenőrzést.

2.3.4. A mérési adatok kinyerése és feldolgozása

2.3.4.1. A kiértékelés során alkalmazott programok és fontos összefüggések

Az adatok kinyeréséhez a FlexAnalysis (Version 2.0 (Build 21), Bruker Daltonik GmbH) software-t használtam. Ezen belül a spektrumok feldolgozásához az SNAP (Sophisticated Numerical Annotation Procedure) csúcsetektálási algoritmust alkalmaztam, ami magában foglalja a belső alapvonal korrekciót és zajmeghatározást (jel/zaj határérték: 3; minőségi faktor határérték: 30). A spektrumok kiértékelése a nátrium addukt figyelembe vételével és elhanyagolásával is elkészült. A relatív jelintenzitások (I_{rel}) meghatározása a kiértékelte spektrumokból szintén a FlexAnalysis software alkalmazásával történt. A mérési adatok feldolgozása során figyelembe vett fetuin és BSA triptikus peptideket az **4.** és **5.** táblázat foglalja össze.

m/z (mi)	start	vége	szekvencia
1252.6208	121	131	(K)pyroGluDGQFSVLFTK(C)
1385.5638	132	143	(K) CDSSPDSAEDVR (K)
1474.8376	334	348	(K) TPIVGQPSIPGGPVR (L)
1513.6587	132	144	(K) CDSSPDSAEDVRK (L)
2008.9545	104	120	(R)pyroGluQTQHAVEGDCDIHVLK(Q)

4. táblázat A MALDI-TOF MS kvantitatív jellegének tanulmányozására kiválasztott triptikus fetuin peptidek. A Cys-oldallánc piridiletílt.

m/z (mi)	start	vége	szekvencia
1017.5800	212	220	(K) VLTSSARQR (L)
1163.6307	66	75	(K) LVNELTEFAK (T)
1249.6212	35	44	(R) FKDLGEEHFK (G)
1479.7954	421	433	(K) LGEYGFQNALIVR (Y)
1534.7491	298	309	(K) LKECCDKPLLEK(S)
1639.9377	437	451	(R) KVPQVSTPTLVEVSR (S)
1881.9051	508	523	(R) RPCFSALTPDETYVPK(A)

5. táblázat A MALDI-TOF MS kvantitatív jellegének tanulmányozására kiválasztott triptikus BSA peptidek. A Cys-oldallánc karbamidometilezett.

A diagramok elkészítéséhez, a determinációs koefficiens (R^2) számolásához és az F- és t-próbák elvégzéséhez a Microsoft Office Excel (2003) programot használtam fel.

A koncentráció arányok (X') relatív intenzitásokból (y') való meghatározása az 1. egyenlet alapján történt.

1. egyenlet: $X' = \bar{x} + \frac{\bar{y}' - \bar{y}}{b}$ (145) (Eisenhart Eq., 26.)

A fenti egyenletből kapott X' érték 95 %-os konfidencia határát („inverz” konfidencia határ, fiduciális határ) a 2. egyenletből határoztuk meg.

2. egyenlet: $X'_{95} = \bar{x} + \frac{b(\bar{y}' - \bar{y})}{C} \pm \frac{t_{.05} \cdot s_{yx}}{C} \sqrt{B(\bar{y}' - \bar{y}) + \frac{C(N + N')}{NN'}}$ (145)

(Eisenhart, Eq.25.)

ahol x a koncentráció arány

y a relatív intenzitás

\bar{y} az eredeti N számú mérés relatív intenzitásainak középértéke

\bar{x} az eredeti N számú mérés koncentráció arányainak középértéke

\bar{y}' a további N' számú mérés relatív intenzitásainak középértéke, a megfelelő ismeretlen koncentráció arányok (X') meghatározásához;

$Q_y = \Sigma(y - \bar{y})^2$; $Q_x = \Sigma(x - \bar{x})^2$ és $Q_{xy} = \Sigma(y - \bar{y}) \cdot \Sigma(x - \bar{x})$ az eredeti relatív intenzitás arányok (y) és koncentráció arányok (x) értékeiből számolt négyzetes eltérések összege.

b a regressziós koefficiens, $b = Q_{xy} / Q_x$;

s_{yx} az eredeti relatív intenzitás arányok (y) standard deviációja a regresszió alapján

számolt Y körül $N-2$ szabadsági fok esetében. $s_{yx} = \sqrt{\frac{Q_y - Q_{xy}^2 / Q_x}{N - 2}}$;

$B = 1 / Q_x$

$t_{.05} = N-2$ szabadsági fok esetében a kétoldali 5%-os szignifikancia határ,

$C = b^2 - t_{.05}^2 \cdot s_{yx} \cdot B$;

A továbbiakban a statisztikai kiértékelések során alkalmazott alapfogalmakat és módszereket tárgyalom.

2.3.4.2. Statisztikai kiértékelések során alkalmazott alapfogalmak

Szórás, standard deviáció [$\delta/s/SD$]:

A szórás kiszámításakor az egyes értékek számtani átlagtól való eltérését mérjük és az eltérések négyzetével számolunk.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}; \text{ vagy } s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}};$$

ahol $n-1$ a szabadsági fok és n a megfigyelések száma,

$\sum (x - \bar{x})^2 = \sum_{xx} = Q_x = SSQ$ [sum of squares], azaz az egyes értékek négyzeteinek összege, ahol az alsó index azt jelzi, hogy milyen adatokra vonatkozik. Tilos a szórásokat összeadni, komponenseire bontani, mindezt a varianciákkal és a négyzetes eltérések összegével lehet.

Variancia [$V(x)/s^2$]: A négyzetes eltérések átlaga.

$$V(x) = s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1};$$

A szórást a varianciából származtatjuk, ezért az összeadásukat, illetve összehasonlításukat a varianciákkal végezzük. Összegek és különbségek varianciája a tagok varianciájának összege:

$$s_{diff}^2 = s_x^2 + s_y^2$$

A különbség vagy összeg szórása a variancia négyzetgyöke:

$$s_{diff} = \sqrt{s_x^2 + s_y^2}; \text{ ha } x \text{ és } y \text{ független.}$$

Amennyiben x és y nem függetlenek, akkor a korrelációs együtthatót (r) figyelembe kell venni.

A variancia a szóródást, a megbízhatatlanságot mutatja, míg az invariancia [a variancia reciproka ($1/\text{Variancia}$)] a megbízhatóságot jelzi.

Középérték szórása, standard error ($s_{\bar{x}}$; S.E.):

A középérték szórása csakis a munkánknak, a kijött eredményeknek a megbízhatóságát mutatja, míg a szórás (s) azt jelzi, hogy a valóságban mekkora a szóródás. A középérték szórását az adatokból nyert varianciának és a megfigyelések hányadosának a négyzetgyöke adja meg.

$$s_x = \sqrt{\frac{s^2}{n}}; \text{ illetve } s_x = \sqrt{\frac{\sum_{xx}}{n(n-1)}}; \text{ ahol } n \text{ a megfigyelések száma.}$$

Az egyenletből látszik, hogy minél több a megfigyelések száma, a középértékre annál megbízhatóbb értéket kapunk, illetve a megfigyelések számának négyzetgyökével arányosan csökken a standard error.

Regresszió: két változó közötti kapcsolatot jelenti, ahol az egyik változó (x) nem valószínűségi változó, hanem általunk önkényesen választott értékű. A két változó kapcsolatát a regressziós egyenes fejezi ki és az összefüggés mértékét a regressziós egyenes meredeksége (b) jelzi. Ez utóbbi paraméter regressziós együttthatóként is ismert. A regressziószámítás tehát arra ad választ, hogy két kvantitatív változó között van-e kapcsolat, és amennyiben van, akkor az milyen fokú.

Korreláció: két kvantitatív valószínűségi változó (x, y) közötti kapcsolatot jelenti, amelyet korrelációszámítással mutathatunk ki. Az összefüggés mértékét a korrelációs koefficiens (r) értéke jelzi.

Determinációs együtttható (R^2): azt jelzi, hogy Y varianciájának hányad részét, hány százalékát magyarázza X varianciája, és viszont. Ez azt jelenti, hogy x változása várhatóan milyen mértékben jár a másik változó változásával, vagyis mennyire lehet előre jelezni az egyiket a másiktól. A determinációs koefficiens meghatározza, „determinálja” hogy X és Y milyen erősségű lineáris kapcsolatban van egymással:

$$0 \leq \text{Det}(Y, X) \leq 1$$

- ha $\text{Det}(Y, X) = 0$, akkor X nem tartalmaz lineáris jellegű információt Y-ra nézve
- ha $\text{Det}(Y, X) = 1$, akkor X lineáris formában teljesen meghatározza, hiba nélkül előre jelzi az Y-t.
- $\text{Det}(Y, X)$ szimmetrikus: $\text{Det}(Y, X) = \text{Det}(X, Y)$.

Korrelációs együtttható/korrelációs koefficiens (r): azt mutatja meg, hogy 2 változó között milyen szoros lineáris típusú kapcsolat van. A korrelációs együtttható a

determinációs együttható négyzetgyöke. ρ az elméleti, r a tapasztalati korrelációs együttható jele.

$-1 \leq \rho(X,Y) \leq 1$, ahol $\rho(X,Y)$, ρ_{xy} vagy ρ

$r=1$: tökéletes pozitív korreláció

$r=-1$: tökéletes negatív korreláció

$r=0$: nincs lineáris korreláció

- ha X és Y független, akkor $\rho(X,Y) = 0$
- Ha $r(X,Y) = 0$, vagyis ha X és Y korrelálatlan, akkor nem feltétlenül függetlenek, de biztos, hogy nincs köztük kimutatható lineáris típusú összefüggés.
- Ha X és Y együttes eloszlása normális, azaz bármely rögzített $X = x$ mellett Y normális, akkor a függetlenség és a korrelálatlanság ekvivalens.
- r előjele összhangban van a regressziós egyenes irányával. Ha a regressziós egyenes emelkedő, akkor X és Y között pozitív a korreláció, ha ereszkedő, akkor r negatív.
- kvantitatív (scale) változók közötti függetlenséget vizsgál
- nem hordoz információt a változó közötti ok-okozati összefüggés irányáról

Determinációs együttható és a regressziós koefficiens közötti összefüggés:

Az y x-re vonatkoztatott regressziós együtthatója b_{yx} , az x y-ra vonatkoztatott regressziós együtthatója b_{xy} , ahol $b_{yx} \cdot b_{xy} = [\text{kovariancia}(x,y)/\text{variancia}(x)] \cdot [\text{kovariancia}(x,y)/\text{variancia}(y)]$

$$= \left[\frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} \right]^2 = r^2. \text{ Ezek alapján a korrelációs együttható: } r = \sqrt{b_{yx} b_{xy}}, \text{ ami}$$

azt jelenti, hogy r a két regressziós koefficiens mértani középértéke. Amennyiben $r = 0$, a determinációs együttható két komponense ($b_{yx} \cdot b_{xy}$) merőleges egymásra, amennyiben $r = 1$, úgy a két egyenes teljesen azonos (146,147)

95%-os konfidencia intervallum: Az a tartomány, ahová a mérési adatok 95%-a esik. A 95%-os megbízhatósági határokat a varianciák alapján kiszámított hibával szokták ábrázolni. A középértékek megbízhatóságának meghatározása során ennek a szórása, azaz a „standard error” alapján számolnak. A konfidencia határ

meghatározásának egyenlete: $\bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{N}}$; ahol t a választott szignifikancia szintre (esetünkben 5%), és az $N-1$ szabadsági fokra vonatkozó kritikus t érték.

Fiduciális tartomány, vagy inverz konfidencia intervallum: Egy adott y értékből számolt X érték megbízhatósági határai.

A konfidencia intervallum általában szimmetrikus, míg a fiduciális tartomány nem, az x átlaghoz (\bar{x}) közelebb eső oldalon keskenyebb. Amennyiben az iránytangens, azaz a kalibrációs egyenes meredeksége 1-nél nagyobb, a fiduciális a szűkebb, amennyiben 1-nél kisebb, úgy a konfidenciális.

F-próba: Alapja a varianciák összehasonlítása: $F[f_1; f_2] = \frac{s_1^2}{s_2^2}$;

ahol f_1 és f_2 a megfelelő s_1 és s_2 standard deviációhoz tartozó szabadsági fokok. A számlálóban mindig a nagyobb s^2 szerepel.

F-próba során azt vizsgáljuk, hogy a csoportok közötti variabilitás nem nagyobb-e szignifikánsan, mint a csoporton belül fennálló variabilitás. Azaz a mi esetünkben az a kérdés, hogy különböző koncentráció arányokhoz tartozó relatív intenzitások (y) különbsége okozta variabilitás nagyobb-e szignifikánsan, mint az azonos koncentráció arányhoz tartozó y értékek variabilitása. A szignifikancia mértékének meghatározása az F-táblázat alapján történhet. Amennyiben a csoportok különbsége okozta variabilitás nem nagyobb, mint a csoporton belül fennálló, akkor a csoportok nem különböznek egymástól. A regressziós összefüggés vizsgálata, azaz a varianciaanalízis során két F-próbát alkalmaztunk: $F_{[1, N-k]}$ - és $F_{[k-2, N-k]}$ -próbát.

$F_{[1, N-k]}$ -próba: A regresszió szignifikanciájának meghatározására alkalmazott próba, amely a regresszió (esetünkben a koncentráció arány és a relatív intenzitások közötti összefüggés) okozta deviációt hasonlítja össze a hiba okozta deviációval:

$$F[f_R; f_H] = F[f_1, f_{N-k}] = F[f_1; f_{81}] = \frac{MSQ[R]}{MSQ[H]}, \text{ ahol}$$

$$MSQ = \frac{SSQ}{f} \text{ (Mean of Squares), és az SSQ a négyzetes eltérés [Sum of Squares].}$$

Az $MSQ[R]$ a regresszióra, az $MSQ[H]$ a hibára vonatkozik.

A regresszióhoz tartozó szabadsági fok 1, a hibához tartozó $N-k$.

Amennyiben a regressziós összefüggés okozta eltérés szignifikánsan nagyobb, mint az egyenes körüli szóródás, akkor kapcsolat, azaz regresszió áll fenn a két változó között.

$F_{[k-2, N-k]}$ -próba: A regresszió linearitásának jellemzésére szolgál:

$$F[f_L; f_H] = F[f_{k-2}, f_{N-k}] = F[f_7; f_{81}] = \frac{MSQ[L]}{MSQ[H]}; \text{ ahol}$$

$MSQ[L]$ a linearitástól való eltérés MSQ értéke, az $MSQ[H]$ a hiba MSQ értéke. A linearitástól való eltéréshez tartozó szabadsági fok $k-2$, a hibához tartozó $N-k$ (definíciójukat lásd alább). Amennyiben az eredmény nem szignifikáns, úgy a regressziós összefüggés lineáris jellegű.

A kalibrációs egyenesnek tekinthető regressziós egyenesek meredekségének 0-tól való eltérését és a különböző mintaösszetétel mellett kapott kalibrációs egyenesek meredekségeinek eltérésére vonatkozó szignifikancia tesztet kétmintás t-próbával végeztük el.

Kétmintás t-próba: két empirikus minta középtértékének \bar{x} összehasonlítására szolgál. A differenciát a saját hibájához hasonlítjuk. A kétmintás t-próba szabadságfoka kettővel kisebb, mint az összes megfigyelés száma (N), mivel mindegyik csoport négyzetes eltérését a mintákon kapott 2 darab középtől számítjuk.

$$t_{[N-2]} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}}; \text{ ahol } n_1 + n_2 = N$$

Az egyenes 0-tól való eltérésének meghatározására vonatkozó egyenlet:

$$t_{[N-2]} = \frac{b-1}{s_b}; \text{ ahol } s_b \text{ a meredekség szórása.}$$

2.3.4.3. Statisztikai kiértékelések során alkalmazott módszerek

A MALDI-TOF kvantitatív jellegének vizsgálata során végzett mérések eredményeinek a feldolgozása a következőkben ismertetett statisztikai módszerekkel, a regresszióanalízissel és a varianciaanalízissel történt (148). Új mérési eljárások megbízhatóságának értékelésére ezek a leggyakrabban alkalmazott műveletek. Mivel minden egyes független változóhoz (esetünkben a koncentráció arányhoz) a tíz párhuzamos mérésekből

több függő változó (azaz relatív intenzitás) tartozott, ezért csoportosított adatokból végzett regresszióanalízist végeztünk. Az ideális esetben a regressziós egyenes (ami a kvantitatív mérések szempontjából a kalibrációs egyenes) meredeksége (b) 1, a tengelymetszete (a) 0 értéket vesz fel. A statisztikai számolásokat a mérésekhez tartozó paraméterek alapján végeztük el: n, k, N, ahol n a párhuzamos mérések száma, k a független változók, azaz a mérési pontok száma és N az előbbieket által meghatározott összes mérés száma ($N = n \cdot k$). Az irodalom alapján (148) a párhuzamos mérések számának minimum kettőnek kell lennie, de ez általában 3-6, ugyanakkor bizonyos esetekben 8-12 párhuzamos mérésre van szükség. A szisztémás hibák, illetve az ezektől való mentességnek a kimutatására minimum 40-60 mérési adatra van szükség. A mérési pontok számának (k) 3-6 ($N = 18-48$), illetve szisztémás hibák esetében 6-10 ($N = 48-120$) értéknek kellene lennie. A MALDI-TOF MS mérések szempontjából irodalmi adatok (61) alapján min. 7 mérést kell végezni ahhoz, hogy a detektált komponensek száma ne változzon, azaz a mérések során az összes lehetséges komponenst detektálni tudjuk egy mintából. A fentiek alapján a MALDI-TOF reprodukálhatóságának és kvantitatív jellegének a vizsgálata során $n = 10$ párhuzamos mérést végeztem $k = 9$ különböző koncentrációnál.

A koncentráció arányok és a megfelelő relatív intenzitások közötti összefüggés, azaz a regresszió szignifikanciájának a meghatározása $F_{[1, N-k]}$, és a linearitásának jellemzése $F_{[k-2, N-k]}$ -próba alkalmazásával történt az n, k és N értékeknek megfelelően. Ezután a regressziós egyenesek, azaz a kvantitatív mérések szempontjából kalibrációs egyenesnek megfelelő egyenesek meredekségének a szignifikanciájának a meghatározására a $t_{[N-2]}$ -próba szolgált. A különböző kémiai környezetben az adott komponensekre vonatkozó kalibrációs egyenesek meredekségét, azok eltéréseinek szignifikanciáját kétmintás t-próbával ($t_{[N-2]}$) mutattuk ki.

A kvantitatív mérésekhez alkalmazott kalibrációs egyenes minőségét jellemző determinációs együttható (R^2) meghatározása Microsoft Excel program segítségével történt. Adott, állandó mennyiségben jelenlévő komponensek jelintenzitása közötti korreláció szignifikanciájának a meghatározását $t_{[n-2]}$ -próbával végeztük el. Az általunk alkalmazott rendszereknél nyert kalibrációs egyenesek felhasználásával, adott összetételű minták esetében kapott koncentráció arányok precizitásának jellemzésére az „inverz” *konfidencia határok*, azaz a *fiduciális határok* meghatározása szolgált.

A szignifikancia próbák a véletlen szerepének megítélésére szolgálnak, azaz a szignifikanciapróbák arra adnak válasz, hogy mit várhatunk, ha nincs hatásos beavatkozás. Ugyanakkor a kutató azt szeretné igazolni, hogy a vizsgált beavatkozás hatásos, azaz a kutató hipotézise, hogy van hatás, a matematikusé, hogy nincs. Ezért is beszélünk egyrészt

munkahipotézisről, illetve “null-hipotézis”-ről. Amennyiben a hatás szignifikánsnak minősül, a kutató megtartja a munkahipotézist, a matematikus elveti a “null-hipotézis”-t. Ennek megfelelően, amennyiben például azt vizsgáljuk, hogy eltér-e az egyenes meredeksége 0-tól, akkor a “null-hipotézis” az, hogy nem tér el. Amennyiben szignifikáns az eredmény, úgy matematikailag elvetik a “null-hipotézis”-t, azaz azt, hogy nincs jelentős mértékű eltérés 0-tól. Kutatóként elfogadjuk a munkahipotézist és szignifikánsnak minősítjük a meredekség eltérését 0-tól. A regresszió szignifikanciájának vizsgálata során azt néztük meg, hogy a mérések során adott komponensekre vonatkozó relatív intenzitások változását milyen mértékben okozza a „véletlen” és milyen mértékben határozza meg azok koncentráció arányának változása. Ez azt jelenti, hogy amennyiben más nincs, csak a „véletlen”, akkor elég gyakran okoz-e egymaga a véletlen akkora eltérést (vagy még nagyobb), amekkorát a vizsgálat során észleltünk? Azaz a null-hipotézis, hogy a véletlen okozza a változást, a munkahipotézis, hogy koncentráció arány változása. Ennek figyelembe vételével, amennyiben elég gyakran okoz a véletlen ekkora változást, abban az esetben azt mondjuk, hogy az észlelt eltérést a véletlen is okozhatta, tehát nincs kellő bizonyossággal igazolva, hogy a munkahipotézisben feltételezett beavatkozás ($c_{rel} \uparrow$) okozná. Más szemszög alapján a null-hipotézist elfogadjuk. Amennyiben ritkán okoz a véletlen ekkora változást, úgy szignifikánsnak minősítjük az eltérést, azaz y változását a koncentráció arány változása okozta. Más nézőpontból a null-hipotézist elvetjük. A leggyakrabban alkalmazott próbák során az „elég gyakran” $p=0.05$ -ot, azaz 5%-ot jelent. Ezek alapján az olyan eltérést, amit adott körülmények között a véletlen csak legfeljebb minden huszadik esetben szokott okozni, szignifikánsnak minősítjük. A szignifikanciánál többet mondanak azonban a megbízhatósági és fiduciális határok, ezért az eredményeink megbízhatóságának és precizitásának jellemzése céljából 95%-os megbízhatóság mellett ($p=0.05$) meghatároztuk a konfidencia intervallumot és *inverz* konfidencia intervallumot, vagyis a *fiduciális* határokat. Amennyiben két különböző érték megbízhatósági intervallumai nem fednek át, akkor azok szignifikánsan eltérnek. A mi vizsgálataink során a független változó (x), vagyis adott komponensekre vonatkozó koncentráció arány az ok, és a mérések során az adott x értékekhez kapott relatív intenzitás (y) az okozat. Az egész koncentráció tartományra vonatkozó relatív intenzitásokra meghatároztuk azt a tartományt, ahová a mérési adatok (I_{rel}) 95%-a esik, azaz az úgynevezett 95%-os konfidencia sávot, illetve a mérésekből meghatározott X értékek fiduciális határait, vagy más néven az *inverz* konfidencia intervallumot.

A varianciaanalízis és a regresszióanalízis során alkalmazott számolások vázlatát a **6.a** és **6.b** táblázat mutatja (148).

mérési pont	koncentráció arány	n_i	$\sum y_i$	$\sum y_i^2$	Q_{yi}	$x_i \sum y_i$
1.	0.5	10				
2.	1	10				
3.	1,5	10				
4.	2	10				
5.	3	10				
6.	4	10				
7.	5	10				
8.	7.5	10				
9.	10	10				
	Összesen	$N = n \cdot k$	$\sum \sum y_i$	$\sum \sum y_i^2$	$\sum Q_{yi}$	$\sum (x_i \sum y_i)$

6. a

szóródás oka	SSQ	szabadsági fok (sz.f)	MSQ	$F_{ }$	P
regresszió	Q_R	1	$Q_R/1$	$F_{[1, N-k]} = F_{[1, 81]}$	
Linearitástól való eltérés	Q_L	k-2	$Q_L/(k-2)$	$F_{[k-2, N-k]} = F_{[7, 81]}$	
hiba	Q_H	N-k	$Q_H/(N-k)$	-	-
összesen	Q_V	N-1	-	-	-

6.b

6. táblázat 6.a, A mérési eredmények megbízhatóságának számítása regresszióanalízissel 6.b, A regressziós összefüggés vizsgálata varianciaanalízissel. 6.a, Az üres négyzetekbe az egyes mérések során kapott intenzitásokból meghatározott értékek kerültek. 6.b, P meghatározása az F-próba eredményének F-táblázatban való összevetésével történt. A regresszióanalízis és a varianciaanalízis során alkalmazott összefüggések rövid összefoglalója, ahol k: a mérési pontok (koncentráció arányok) száma; n: adott mérési pontban végzett mérések száma (n=10); y_i : az n mérés i-edik mérése során kapott relatív intenzitás; N: összes

mérés száma, $N = n \cdot k$; $Q_y = \sum (y - \bar{y})^2 = \sum \sum y_i^2 - \frac{(\sum \sum y_i)^2}{N}$; $Q_x = \sum (x - \bar{x})^2 = \sum (n_i x_i^2) - \frac{[\sum (n_i x_i)]^2}{N}$ és

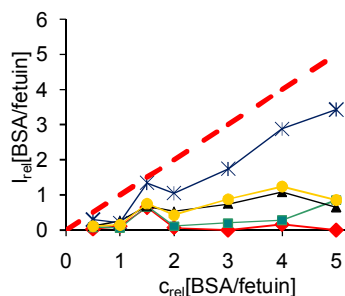
$Q_{xy} = \sum (y - \bar{y}) \cdot \sum (x - \bar{x}) = \sum (x_i \sum y_i) - \frac{[\sum (n_i x_i)] [\sum \sum y_i]}{N}$; $Q_R = \frac{Q_{xy}^2}{Q_x}$; $Q_L = Q_y - (Q_R + Q_B)$ és $Q_H = \sum Q_{y_i}$

(148)

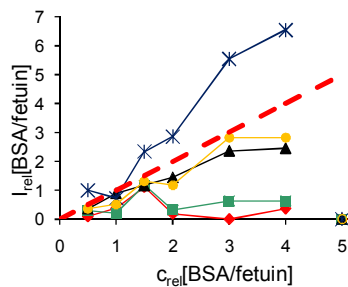
2.4. Eredmények

2.4.1. A szuppresszió hatásának és az egyes méréssorozatok linearitásának tanulmányozása

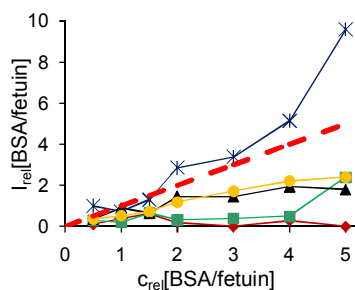
A kvantitatív tömegspektrometriai mérések alapja, hogy a meghatározandó molekula jelintenzitását egy ismert koncentrációjú molekula jelintenzitásához viszonyítjuk. A koncentráció pontos meghatározásához kalibrációs egyenes szerkesztése szükséges, amely lehetővé teszi a két molekula intenzitásarányából azok koncentrációarányainak kiszámítását. Két peptid jelintenzitás- és koncentrációaránya közötti illetén összefüggés vizsgálatára eltérő komplexitású mintasorozatokat vizsgáltam, különféle körülmények között. Minden egyes eltérő komplexitású mintasorozatot többféle körülmény között vizsgáltam. A mérések részletes összefoglalását a **2. táblázat** ismerteti. A mérések során detektált peptidok relatív intenzitásait a koncentráció arányuk függvényében ábrázoltam. Példaként a **11. ábra** két triptikus fehérje-emésztmény keverékének, a **12. ábra** egy szintetikus peptid és egy fehérje triptikus emésztménye keverékének azokat az eredményeit mutatja be, ahol a normalizálás különböző peptidekre történt. A mérések kiértékeléséhez és feldolgozásához felhasznált fetuin és BSA triptikus peptideket a **4. és 5. táblázat** ismerteti. A **11.a és 11.b ábra** jól mutatja, hogy a relatív intenzitáson alapuló kvantifikáció jelentős mértékben függ **a**, a meghatározandó komponensről **b**, a referencia molekulától (standard) **c**, és jelentős mértékben pontatlanok. A **11.b és 12.a-b ábrák** jól szemléltetik a szuppresszió jelenségét. A **11.b ábra** bemutatja, hogy a jelentős mennyiségben jelenlévő (a legnagyobb koncentráció arányhoz tartozó) BSA emésztmény elnyomta az egyik referencia peptid jelét (fetuin $m/z = 1385.56$). A **12.a-b ábra** esetében a Leu- és Arg-peptid nyomta el teljesen a referencia peptidnek a jelét (fetuin $m/z = 1072.6$). A **b** állítás megerősítésére jó példa látható a **12. ábrán**, ahol az Arg-peptid relatív intenzitásának a növekedését tapasztaltuk annak ellenére, hogy az Arg-peptid mennyisége változatlan volt, csak Leu-peptid mennyiségét növeltük. A normalizálás a fetuin $m/z = 1072.60$ tömegű peptidjére történt. A fenti eredmény az adott fetuin peptidnek a Leu-peptid növekvő mennyiségének következtében fellépő szuppressziójával magyarázható. A mérési adatok feldolgozása során kapott görbék lefutását, tendenciáját a különböző mintaelőkészítési eljárások (eltérő mátrix, vagy szárítási technikák alkalmazása), illetve a nátrium addukt figyelmen kívül hagyása jelentős mértékben nem befolyásolta (ezeket az adatokat nem mutatjuk be).



11.a ábra

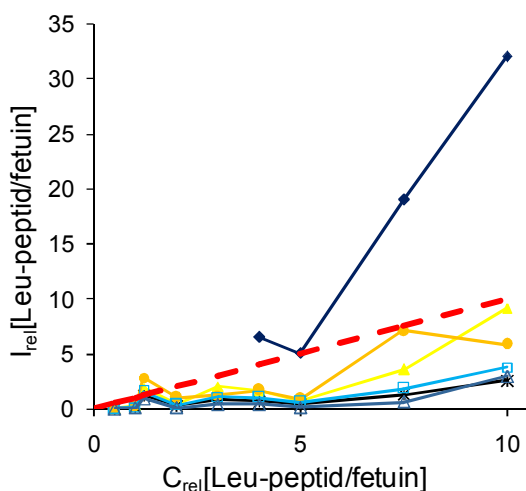


11.b ábra

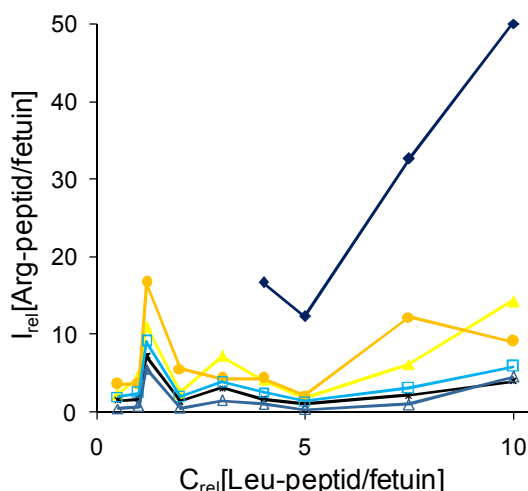


11.c ábra

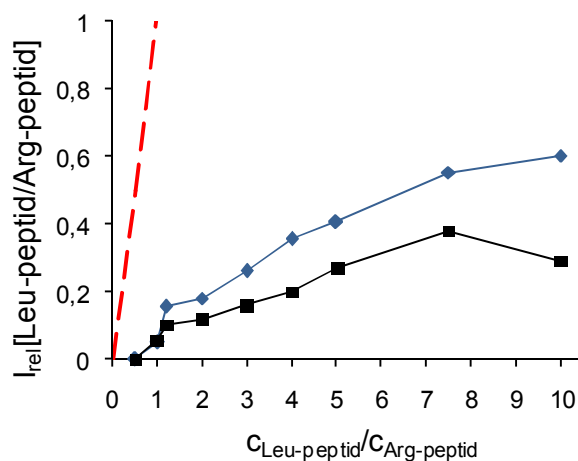
11. ábra A BSA triptikus peptidjeinek relatív intenzitása (I_{rel}) a mintában lévő relatív koncentrációjuk (c_{BSA}/c_{fetuin}) függvényében. Minden egyes kísérlethez a felhasznált minta 100 fmol fetuin triptikus emésztmény és adott mennyiségű BSA triptikus emésztmény keveréke. A relatív intenzitások normalizálása a következő fetuin peptidekre történt: **11.a**, $m/z = 2008.95$; **11.b**, $m/z = 1385.56$; **11.c**, $m/z = 1474.83$. A **11. b ábra** esetében a legnagyobb BSA emésztmény koncentrációjánál az $m/z = 1385.56$ csúcs nem volt detektálható. A szaggatott vonal a teoretikusan várható eredményt reprezentálja, ahol a relatív intenzitás = koncentráció arány. A különböző görbék a BSA következő triptikus peptidjeit jelölik: **♦: $m/z=1017.7$; ■: $m/z=1163.7$; ▲: $m/z=1249.6$; *: $m/z=1479.8$ és ●: $m/z=1639.9$.**



12.a ábra



12.b ábra



12.c ábra

12. ábra, A Leu- és Arg-peptidek relatív intenzitása (I_{rel}) a Leu-peptid/Fetuin koncentráció arány függvényében. A minták adott mennyiségű Leu-peptid és 100 fmol fetuin emésztmény és 100 fmol Arg-peptid keverékei voltak. Az Arg- és Leu-peptideknek különböző fetuin peptidre vonatkoztatott relatív intenzitásainak összehasonlítását mutatják az adott ábrák, rendre **12.a** és **12.b ábra**. A Leu- és Arg-peptidek egymáshoz viszonyított relatív intenzitásait a koncentráció arányuk függvényében a **12.c ábra** szemlélteti. A relatív intenzitások meghatározása a nátrium addukt figyelembe vétele (◆) és elhanyagolása mellett (■) is egyaránt megtörtént. Azoknál a koncentráció arányoknál, ahol az adatok nincsenek ábrázolva, a referencia peptid ($m/z = 1072.60$) szuppressziója teljes volt. A szaggatott vonal a relatív intenzitás = koncentráció arány összefüggést ábrázolja. A referenciapeptidek az egyes görbék esetén a következők voltak: **12.a**, ◆: $1046.6/1072.6$; ▲: $1046.6/1252.6$ *: $1046.6/1385.5$; ●: $1046.6/1474.8$ □: $1046.6/1513.6$; △: $1046.6/2008.9$. **12.b**, ◆: $1003.5/1072.6$; ▲: $1003.5/1252.6$ *: $1003.5/1385.5$; ●: $1003.5/1474.8$ □: $1003.5/1513.6$; △: $1003.5/2008.9$.

2.4.2. A kvantitatív mérések reprodukálhatóságának tanulmányozása

A későbbiekben az állandó mennyiségben jelenlévő triptikus fetuin emésztményt (és néhány esetben Arg-peptidet) tartalmazó komplex minták (**3. táblázat**) szolgáltak a kvantitatív mérések tanulmányozására. A relatív intenzitások és koncentráció arányok közötti linearitás és összefüggés növelése több párhuzamos mérés eredményének feldolgozásával és ábrázolásával történt. A variancia és a reprodukálhatóság jellemzésére az adatokra legjobban illeszkedő egyenes, a *regressziós egyenes* és a mérési eredmények feldolgozásából meghatározott *konfidencia határ* szolgált. A szintetikus peptidek jelének normalizációját több fetuin peptidet választva referenciának (**4. táblázat**) is elvégeztük, majd a relatív intenzitások ábrázolása a koncentráció arányuk függvényében történt. Az eredményeket a következő két példa jól szemlélteti (**13. ábra**). A további 25 diagram a mellékletben található (**M-1 - M-4 ábrák**).

Az egyes méréssorozatok esetében meghatározott regressziós egyenesek jelentették egyben a kalibrációs egyenest is. A MALDI-TOF reprodukálhatóságának és kvantitatív jellegének a vizsgálata során $n = 10$ párhuzamos mérést végeztünk $k = 9$ különböző koncentrációnál, így a következő paraméterekkel kell dolgoznunk: $k = 9$, $n = 10$ és $N = 9 \cdot 10 = 90$.

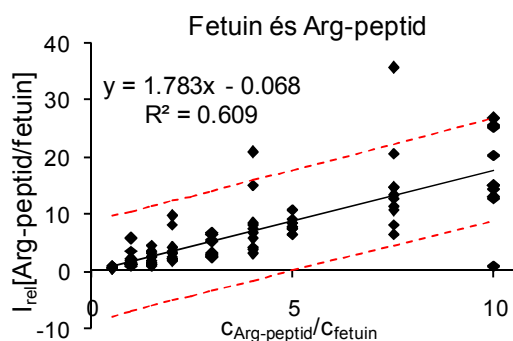
A regresszió szignifikanciájának meghatározása az $F_{[1, N-k]}$ -próba, a linearitásának a jellemzése az $F_{[k-2, N-k]}$ -próba alkalmazásával történt a fenti paramétereknek megfelelően. Ezután a regressziós egyenesek meredekségeinek összehasonlítására és az eltérés szignifikanciájának meghatározására a kétmintás t-próba ($t_{[N-2]}$) szolgált. Végül a regressziós egyenes minőségét jellemző determinációs együttható (R^2) meghatározását végeztük el. A klinikai kémiában a korrelációs koefficiens értékével (r) szemben támasztott követelmény, hogy 0.98-nál nagyobb értéknek kell lennie ($n > 20$ esetén), mivel csak ebben az esetben érvényesül kellően a standard és mért értékek egyezése.

A regresszió minden esetben rendkívül szignifikáns volt ($p < 0.001$), míg az egyenestől való eltérés (divergencia) nem mutatott szignifikáns értéket ($p > 0.05$). Ez azt jelenti, hogy a relatív intenzitás és a koncentráció arány közötti regresszió lineáris. A Leu-peptid esetében a regressziós egyenesek meredeksége elég alacsony értékeket vett fel (0.0099 - 0.1117), ugyanakkor az Arg-peptidhez tartozó egyenesekhez nagyobb meredekségek tartoztak (0.36-2.94) (**7. táblázat**). Ez az Arg-peptid jobb detektálhatóságára vezethető vissza, ami nagy valószínűséggel az Arg-peptid bázikusabb karakteréből ered.

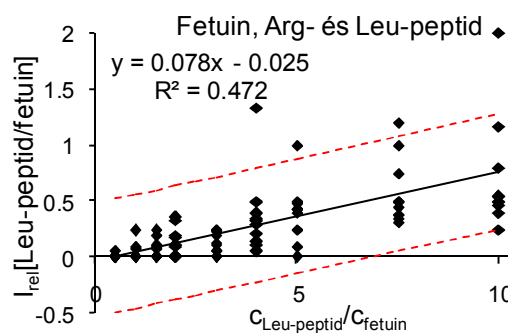
Mindamellett minden egyes megvizsgált egyenes szignifikáns eltérést mutatott a nullától ($p < 0.001$). Az R^2 0.2241 és 0.868 közötti értékeket vett fel (7. táblázat).

A mérési adatok feldolgozását az irodalomban előszeretettel alkalmazott módszer szerint is elvégeztük (49), azaz a relatív intenzitások középértékét ábrázoltuk a koncentráció arány függvényében (14. ábra). Az így kapott R^2 érték 0.845-0.9885 intervallumban mozgott (7. táblázat). A további 25 diagram a mellékletben található (M-5 - M-8 ábrák).

Az összes adat ábrázolása esetén a kapott 95 %-os konfidencia intervallum elég széles volt a kis R^2 értékek mellett, ami egyértelműen mutatja az adatok nagymértékű variációját és alacsony reprodukálhatóságát. Figyelemre méltó azonban, hogy a középértékek ábrázolása esetén az R^2 értékek igen magasak, ami - hamisan - egy igen megbízható regressziós egyenest sejtet.

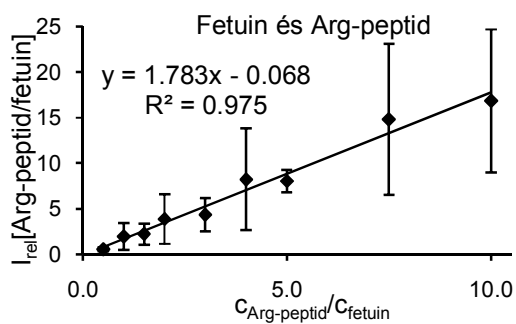


13.a ábra

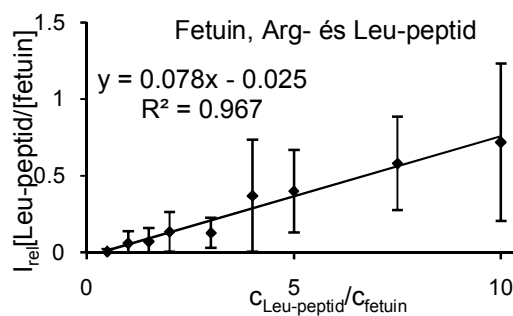


13.b ábra

13. ábra A szintetikus peptid relatív intenzitásának ábrázolása egy fetuin ($m/z=1252.62$) peptidet használva referencia pontnak. 13.a A minta különböző mennyiségű Arg-peptid és 100 fmol fetuin emésztmény keveréke. 13.b A minta 100 fmol fetuin emésztmény és változó mennyiségű Leu- és Arg-peptid keveréke. Mindkét ábra esetében a szaggatott vonalak az adott peptid mért relatív intenzitásainak a 95%-os konfidencia határait szemléltetik.



14.a ábra



14.b ábra

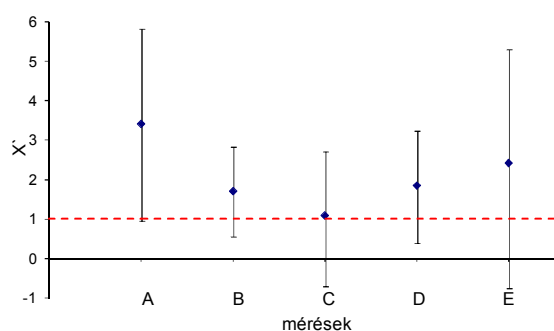
14. ábra A szintetikus peptid relatív intenzitásának ábrázolása egy fetuin peptidet ($m/z=1252.62$) használva referencia pontnak. A relatív intenzitások középértékének ábrázolása a peptidek koncentráció arányának függvényében. A standard deviációt a hibavonalak reprezentálják. **14.a**, növekvő mennyiségű Arg-peptid és 100 fmol fetuin emésztmény keveréke, **14.b** A minta 100 fmol fetuin emésztmény és növekvő mennyiségű Leu- és Arg-peptid keveréke.

vizsgált peptid	mintasorozat	R ²	R ^{2*}	[R ²]	[R ^{2*}]	b	b [*]	a	a [*]	t-teszt	t-teszt*	F-teszt			
												F(1,81)	F(7,81)	F(1,81)*	F(7,81)*
1046/1252	Fet, R↑	0.9031	0.9757	0,4241	0.6093	1.8892	1.7837	+ 1.2324	-0.0685	8.050445	11.71392	64.77212	0.992717	131.4018	0.467333
	Ecoli, Fet, R↑	0.9758	0.9809	0,3861	0.2763	2.9175	2.4462	- 0.5704	1.3999	7.439969	5.796895	51.75726	0.183329	31.16274	0.086717
	Fet, R↑, L↑	0.9677	0.9735	0,2627	0.2444	2.9461	2.0698	- 0.2154	-0.672	5.599526	5.335553	29.20819	0.139375	26.43686	0.102998
1046/1385	Fet, R↑	0.9774	0.9793	0,77	0,7711	1.3684	1.4074	- 0.5099	- 0.4959	17.16449	17.21535	293.9021	0.969377	293.7424	0.888613
	Ecoli, Fet, R↑	0.8475	0.8476	0,2676	0,2688	1.894	1.9182	- 1.302	- 1.3405	5.669686	5.687942	31.67078	0.814407	31.88693	0.819024
	Fet, R↑, L↑	0.9689	0.9703	0,702	0,6943	1.3156	1.2376	- 0.6552	- 0.4687	14.39639	14.13853	206.3896	0.947445	197.7329	0.863841
1046/1474	Fet, R↑	0.9887	0.9885	0,6086	0,6095	1.1784	1.2135	- 0.7123	- 0.7139	11.69788	11.71947	128.2339	0.209324	128.7569	0.213839
	Ecoli, Fet, R↑	0.9749	0.975	0,7918	0,7926	1.1091	1.1276	+ 0.3135	+ 0.2837	18.296	18.34025	341.6159	1.258091	343.2433	1.257085
	Fet, R↑, L↑	0.7985	0.876	0,2676	0,2441	2.5478	1.8642	- 3.1183	- 1.6485	5.670888	5.330101	32.60718	1.175212	27.40292	0.554378
1046/1513	Fet, R↑	0.9706	0.9726	0,6815	0,6812	1.9373	1.9915	- 0.499	- 0.466	13.72172	13.71305	185.3233	0.80222	184.1669	0.740562
	Ecoli, Fet, R↑	0.987	0.9868	0,8646	0,868	1.7041	1.7272	- 0.8409	- 0.879	23.70856	24.05731	564.8241	1.061017	583.9273	1.112372
	Fet, R↑, L↑	0.9587	0.9597	0,6621	0,6451	1.739	1.6471	- 0.654	- 0.4417	13.13041	12.64872	173.3338	1.067524	159.4379	0.956611
1046/2008	Fet, R↑	0.8543	0.845	0,333	0,3237	0.4131	0.427	0.4254	+ 0.4464	6.628745	6.489709	44.2105	1.077317	42.49557	1.113203
	Ecoli, Fet, R↑	0.9525	0.9532	0,2484	0,2523	0.5622	0.5667	+ 0.1967	+ 0.1903	5.392762	5.448639	27.21755	0.194093	27.78666	0.195005
	Fet, R↑, L↑	0.9071	0.8903	0,3012	0,2735	0.4145	0.3669	+ 0.3845	+ 0.2999	6.15888	5.755575	36.52712	0.534457	31.97495	0.56294
1003/1046	Fet, R, L↑	0.9716	0.9858	0,7613	0,866	0.0532	0.0843	- 0.0423	- 0.0725	16.75392	23.85257	284.9416	1.190239	577.261	1.183744
1003/1252	Fet, R↑, L↑	0.9404	0.9671	0,4652	0,4721	0.0476	0.0784	- 0.0461	-0.0256	8.749764	8.871899	74.57757	0.674738	74.72051	0.362716
	Fet, R, L↑	0.9731	0.9644	0,6434	0,6166	0.0607	0.0833	- 0.0411	-0.0545	12.60142	11.89645	153.8455	0.6081	138.493	0.7306
1003/1385	Fet, R↑, L↑	0.9503	0.9862	0,5148	0,6682	0.0362	0.06	- 0.0364	- 0.0355	9.662424	13.31255	90.97895	0.679059	167.8735	0.33672
	Fet, R, L↑	0.9723	0.9775	0,6956	0,6756	0.0503	0.0817	- 0.0377	- 0.0625	14.18007	13.5368	197.9429	0.80422	177.1731	0.58344
1003/1474	Fet, R↑, L↑	0.8805	0.9498	0,4773	0,5046	0.0437	0.0743	- 0.0542	- 0.062	8.963398	9.467173	84.4159	1.637374	87.19044	0.658188
	Fet, R, L↑	0.9737	0.9825	0,7134	0,7043	0.0597	0.0962	- 0.0471	- 0.0765	14.79997	14.47665	216.1279	0.832911	201.4715	0.513999
1003/1513	Fet, R↑, L↑	0.9624	0.9832	0,5106	0,666	0.0468	0.0779	- 0.0425	- 0.0343	9.581798	13.24705	88.09657	0.491413	167.2275	0.408502
	Fet, R, L↑	0.9748	0.9681	0,6705	0,6252	0.0691	0.1117	- 0.0524	- 0.0834	13.38183	12.11602	173.9627	0.641214	142.9744	0.672564
1003/2008.9	Fet, R↑, L↑	0.9634	0.9443	0,3769	0,3956	0.0099	0.0168	- 0.0091	+ 0.0024	7.296276	7.589161	50.15502	0.27252	55.14224	0.46455
	Fet, R, L↑	0.9515	0.8956	0,517	0,4003	0.0141	0.0227	- 0.0087	- 0.011	9.70558	7.664971	91.7142	0.668481	58.64196	0.976501

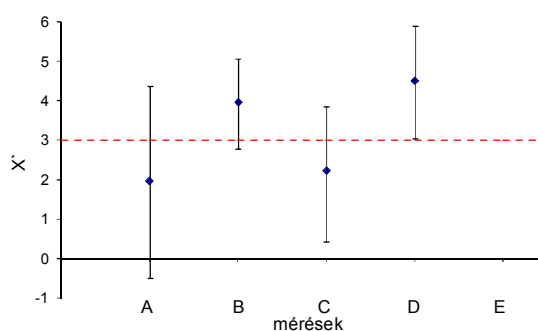
7. táblázat A regressziós egyenesekhez tartozó R² értékek és meredekségek, és az F- és t-próbák eredményei. A csillag a nátrium addukt figyelembe vételével kapott eredményeket jelöli. Az F(1,81) és F(7,81) az F-próbát jelenti, ahol a szabadsági fok, rendre 1 és 81, vagy 7 és 81 volt. Az F(1,81)-próba a regresszió szignifikanciájának meghatározására, az F(7,81) a linearitástól való eltérés, azaz divergencia kifejezésére szolgált. Az "a" érték a regressziós egyenes metszéspontját jelöli az y tengelyen, a "b" adat az egyenes meredekségét határozza meg. A „mintasorozat” oszlop az adott mintasorozaton belül a mintákban konstans, illetve növekvő (↑) koncentrációban jelenlévő peptideket tartalmazza.

A következőkben a koncentráció arányok meghatározásához felhasznált kalibrációs egyenesek használhatósága, illetve megbízhatósága volt a kulcskérdés. Ennek megválaszolására számszerű adatokkal akartuk alátámasztani a számolt értékek megbízhatóságát (vagy éppen megbízhatatlanságát), ahol a becsléseket a fent ismertetett megbízhatósági szinten (95%) végeztük.

Két különböző összetételű mintát kétszer készítettünk el és mindegyik esetében 2*5 mérést végeztünk. Az egyikben az Arg-peptid és a fetuin emésztmény aránya egy volt, a másikban három. Mindkét keverék esetében a koncentráció arány (X') becslését az **1. egyenlet** alapján végeztük el az adott szintetikus peptid relatív intenzitás adatainak felhasználásával, különböző fetuin peptideket használva referencia alapul. Az adatok kinyerése minden egyes peptid esetében a megfelelő kalibrációs egyenes felhasználásával történt. A számított koncentráció-arányokhoz tartozó felső és alsó inverz konfidencia határok meghatározását a 2. egyenlet alapján végeztük. (**15. ábra**).



15.a



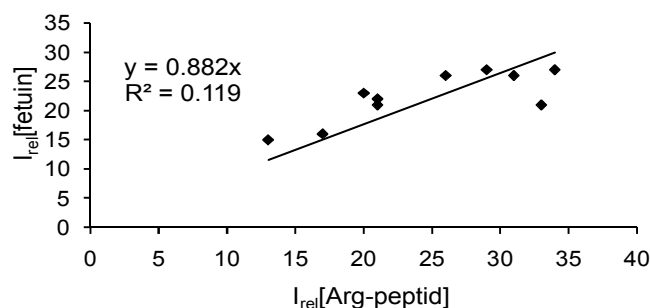
15. b

15. ábra A számolt koncentráció arányok (X') megbízhatósága. A koncentráció arányok becslése a relatív intenzitások (y') alapján, a 95%-os konfidencia határ szintjén történt, amit az hibavonalak reprezentálnak. A fetuin emésztmény és az Arg-peptid mennyiségét állandó értéken tartottuk: **15.a**, $c_{\text{Arg-peptid}}/c_{\text{fetuin}}=1$; **15. b**, $c_{\text{Arg-peptide}}/c_{\text{fetuin}}=3$. Az X' meghatározásához felhasznált kalibrációs egyenesek készítése során a normalizálás különböző fetuin peptidekre történt: **A**: $m/z=1252.6$, **B**: $m/z=1385.5$, **C**: $m/z=1474.8$, **D**: $m/z=1513.6$, **E**: $m/z=2008.9$.

2.4.3. Két, állandó koncentrációban jelenlévő peptid relatív intenzitásai közötti korreláció vizsgálata

A kalibrációs egyenesek és adott összetételű minták ismételt méréséből kapott relatív intenzitások felhasználásával meghatározott kvantitatív értékek pontatlanok voltak. A relatív intenzitások alacsony megbízhatósága tehát azt sugallta, hogy téves feltételezés lehet az adatok kiértékelésében. Ezért annak a hipotézisnek az ellenőrzésére, amely a minta és a standard relatív intenzitása közti arányosságot feltételezi, a két peptid relatív intenzitását ábrázoltuk egymás függvényében (**16. ábra** és **M-9. ábra**).

Az R értéke 6 esetben a vizsgált 9-ből nem jelzett szignifikáns korrelációt, ami arra utal, hogy a relatív intenzitásokat befolyásoló faktorok nem azonos mértékben hatnak a meghatározandó komponensre és a standard molekulára. Tehát ez azt jelenti, hogy a mi esetünkben a referencia pont nem volt megfelelő.



16. ábra Az Arg- és fetuin triptikus ($m/z=1385.56$) peptid relatív intenzitásai közötti korreláció vizsgálata adott mintán belül (100 fmol mindegyik). 300 fmol Leu-peptid szintén jelen volt a mintában. A korrelációs egyenes szigorúan az origón átmenő egyenes, mivel lineáris arányosság feltételezett a jelintenzitások között.

2.4.4. Különböző körülmények között adott peptidekre vonatkozó regressziós egyenesek összehasonlítása

Számos tanulmány esetében az ismeretlen mennyiségű komponens meghatározása külső („external”) kalibrációs egyenes alkalmazásán alapul (49). Ugyanakkor ilyen esetekben a kalibrációs egyenes elkészítéséhez felhasznált elegy molekuláris összetétele eltér az ismeretlen mintáétól. A molekuláris környezet kalibrációs egyenes meredekségét befolyásoló hatásának vizsgálatára összehasonlítottuk a standard egyenesek meredekségét *Escherichia coli* sejtek jelenlétében és hiányában. A molekuláris környezet hatásának a vizsgálata során

kapott eredményeket a **8. táblázat** foglalja össze. Az “a”-val jelölt sor az Arg-peptid különböző peptidekre történt normalizálása során kapott relatív intenzitásainak a koncentráció arány függvényében való ábrázolásakor kapott egyenesek meredekségét mutatja. Ezek alatt az *Escherichia coli* sejtek jelenlétében az adott peptidekre vonatkozó kalibrációs egyenesek meghatározott értékei találhatóak (“b” sor). Az egyenesek meredekségének páronkénti összehasonlítása t-próba felhasználásával történt (t_{ab} -vel jelölve), amelynek eredményeit az utolsó oszlop tartalmazza. Az előbbiekhöz hasonló módon az Arg-peptid különböző fetuin peptidekre (standard) vonatkozó kalibrációs egyenesét úgy is elkészítettük (“c” sor), hogy az Arg-peptid mennyiségének növekedésével a Leu-peptid koncentrációja is párhuzamosan növekedett. Az így kapott egyeneseket t-próba alkalmazásával szintén összehasonlítottuk a Leu-peptidet nem tartalmazó minták során kapott egyenesek meredekségével, amit a táblázatban t_{ac} -vel jelöltünk. A molekuláris környezet változása szinte minden esetben az adott peptidekre vonatkozó kalibrációs egyenesek meredekségének rendkívül szignifikáns változását eredményezte.

vizsgált peptid		mintasorozat	b	s^2_b	t-próba	p	b*	$s^2_{b^*}$	t-próba*	p*
1046/1252	a	Fet, R↑	1.889	0.0551			1.7837	0.0232		
	b	E. coli, Fet, R↑	2.918	0.1538	t_{ab}	-21.3465	p<0.001	2.4462	0.1781	t_{ab} -14.0098 p<0.001
	c	Fet, R↑, L↑	2.946	0.2768	t_{ac}	-17.4045	p<0.001	2.0698	0.1505	t_{ac} -6.5129 p<0.001
1046/1385	a	Fet, R↑	1.368	0.0064			1.4074	0.0067		
	b	E. coli, Fet, R↑	1.894	0.1116	t_{ab}	-14.5186	p<0.001	1.9182	0.1137	t_{ab} -13.9648 p<0.001
	c	Fet, R↑, L↑	1.316	0.0084	t_{ac}	4.1305	p<0.001	1.2376	0.0077	t_{ac} 13.4492 p<0.001
1046/1474	a	Fet, R↑	1.178	0.0101			1.2135	0.0107		
	b	E. coli, Fet, R↑	1.109	0.0037	t_{ab}	5.5920	p<0.001	1.1276	0.0038	t_{ab} 6.7672 p<0.001
	c	Fet, R↑, L↑	2.548	0.2019	t_{ac}	-28.2150	p<0.001	1.8642	0.1223	t_{ac} -16.9237 p<0.001
1046/1513	a	Fet, R↑	1.937	0.0199			1.9915	0.0211		
	b	E. coli, Fet, R↑	1.704	0.0052	t_{ab}	13.9643	p<0.001	1.7272	0.0052	t_{ab} 15.4773 p<0.001
	c	Fet, R↑, L↑	1.739	0.0175	t_{ac}	9.7182	p<0.001	1.6471	0.0170	t_{ac} 16.7505 p<0.001
1046/2008	a	Fet, R↑	0.413	0.0039			0.427	0.0043		
	b	E. coli, Fet, R↑	0.562	0.0109	t_{ab}	-11.6454	p<0.001	0.5667	0.0108	t_{ab} -10.7685 p<0.001
	c	Fet, R↑, L↑	0.415	0.0045	t_{ac}	-0.1448	p>0.8	0.3669	0.0041	t_{ac} 6.2229 p<0.001

8. táblázat

8. táblázat A molekuláris környezet hatása a kalibrációs egyenesek meredekségére. A nyilak (↑) a változó koncentrációban szereplő mintakomponenseket jelölik. s^2_b a meredekség (b) varianciáját jelzik, p a meredekségek közötti differencia szignifikanciáját jelenti. A csillaggal jelölt adatok a nátrium addukt figyelembe vételével kapott értékekkel végzett számolás eredményeit mutatják be.

2.4.5. Kvantitatív mérések tanulmányozása stabil-izotóppal jelölt peptid alkalmazásával

A stabil izotóppal jelölt származékok kvantitatív mérésekben való alkalmazása során megfigyelt javulás mértékének vizsgálatára és számszerű kifejezésére számos mérést végeztünk el. A citokróm C fehérje egyik triptikus peptidjét (P peptid, **1. táblázat**) és ennek stabil izotóppal jelölt származékát (P* peptid) használtuk fel a két mintasorozat (**3. táblázat**) elkészítéséhez, majd a mérést követően az adatokon a fentiekhez hasonló statisztikai elemzést végeztünk. Az előbbi eredményekhez hasonlóan az adott két peptid koncentráció aránya és relatív intenzitása közötti összefüggés jelentős mértékű szignifikanciát és linearitást mutatott, ahol az egyenes meredeksége szintén szignifikánsan eltért 0-tól (**9. táblázat**).

mintasorozat	[R ²]	R ²	meredekség	a	t-próba	F-próba	
						F[1,81]	F[7,81]
Fet, P*, P↑	0.8596	0.7842	8.2446	- 12.615	17.88332	723.9309	16.88533
Ecoli, Fet, P*, P↑	0.9464	0.9247	2.955	- 2.408	32.87785	3273.287	26.49675

9.a

mintasorozat	[R ²]	R ²	meredekség	a	t-próba	F-próba	
						F[1,63]	F[5,63]
Fet, P*, P↑	0.9888	0.961	3.1992	- 1.358	40.90807	2149.75	4.870647
Ecoli, Fet, P*, P↑	0.9952	0.9871	1.9365	- 0.1197	71.99766	7624.093	7.402778

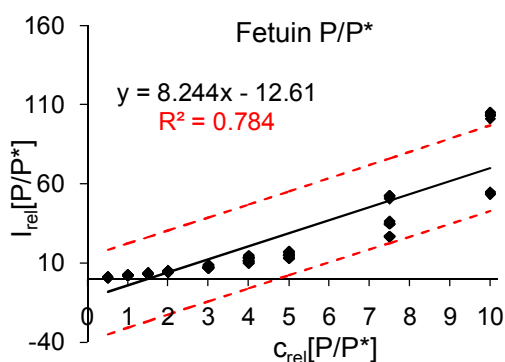
9.b

9. táblázat R² értékek, a legjobban illeszkedő egyenesek meredeksége és az F- és t-próbák eredményei. **9.a**, $0.5 \leq c_p/c_{p*} \leq 10.0$ ($k = 9$, $n = 10$ és $N = 90$), **9.b**, $0.5 \leq c_p/c_{p*} \leq 5.0$ ($k = 7$, $n = 10$ és $N = 70$) közötti koncentráció tartományt veszi figyelembe. Az F(1,N-k) és F(k-2,N-k), azaz F(1,81) és F(7,81) (**9.a**), illetve F(1,63) és F(5,63) (**9.b**) az F-próbát jelölik, ahol a szabadsági fok 1 és 81, illetve 7 és 81 (**9.a**), vagy 1 és 63, illetve 5 és 63 (**9.b**). Az F(1,N-k)-próbák a regresszió szignifikanciájának meghatározására, az F(k-2,N-k)-próbák a lineáristól való eltérés tesztelésére szolgálnak. Az “a” érték a pontokra legjobban illeszkedő egyenes és az y koordináta metszéspontját határozza meg. A szögletes zárójelek azokat az eseteket mutatják, ahol a regresszió meghatározása az átlagra történt. A “mintasorozat” oszlopban az adott mintában állandó, vagy növekvő (↑) koncentrációban jelenlévő peptidok találhatóak. A nátrium adduktokat figyelembe vettem.

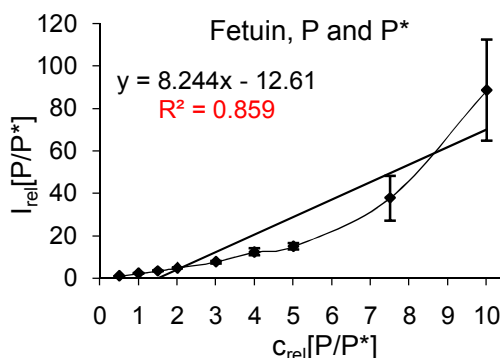
A determinációs koefficiens (R²) (0.7842 és 0.9247; *Escherichia coli* sejttenyészet jelenléte nélkül, vagy jelenlétében, rendre) (**17.a és M-10.a ábra**) és a 95%-os konfidencia tartomány (rendre, 46.77-47.84 és 10.32-10.55 széles) (**17.a és M-10.a ábra**) csak kisebb mértékű

javulást mutatott a kvantitatív mérések vizsgálatához nem stabil izotópszármazékot alkalmazó mérések eredményeihez képest (**17.a. és M-10.a ábra vs. 13.a. és M-1-4. ábra**). Amennyiben azonban a koncentráció arányt csak a 0.5-5.0 intervallumban vettük figyelembe, drasztikusan beszűkült a konfidencia intervallum (4.01-4.09 és 1.37-1.40 széles, rendre) (**18. és M-11. ábra**) és jelentős mértékben megnövekedett az R^2 értéke (0.961 és 0.9871, rendre) (**9.b táblázat**). Az alacsony variancia (szűk konfidencia intervallum) a két peptid relatív intenzitásának adott koncentráció tartományon belül lévő nagyfokú korrelációjával magyarázható (pl., **19.a ábra és M-12.a-f, M-13.a-g ábrák**), ami azt jelzi, hogy ezen peptidek detektálhatóságát befolyásoló faktorok azonos mértékben hatnak rájuk. Ugyanakkor a korreláció csökkenése figyelhető meg az ötszörösénél nagyobb koncentráció arányok esetében (**19.a ábra vs. 19.b ábra és M-12.a-f ábrák vs. M-12.g ábrák, M-13.a-g ábrák vs. M-13.h-i ábrák**). Következésképpen a relatív intenzitás arányok nem lineáris kapcsolata a koncentráció-arányokkal (**17.b ábra, M-14. és M-15. ábrák**) magyarázza az R^2 érték csökkenését és a széles konfidencia intervallumot, amennyiben a 0.5-10 koncentráció aránynak megfelelő intervallumot vettük figyelembe. Érdekes módon az *Escherichia coli* sejttenyészet jelenlétében történő mérések során a variancia növekedése nem volt olyan jelentős mértékű (**M-15. ábra**). Ez valószínűleg az *Escherichia coli* sejttenyészet jelenlétében megfigyelt egyenletesebb kristályképződéssel magyarázható. A fentiekhez hasonlóan a baktérium sejttenyészet jelenléte jelentős mértékben megváltoztatta a kalibrációs egyenes meredekségét (**10. táblázat**), ami ismét kihangsúlyozza magának a mintának a felhasználását a kalibrációs egyenes készítéséhez. Végül két különböző összetételű mintát tízszer mértük meg és a mérés során kapott relatív intenzitásokból meghatároztuk az adott peptidek (P és P*) koncentráció arányait a hozzájuk tartozó 95%-os inverz konfidencia határokkal, rendre az **1. és 2. egyenlet** alkalmazásával. A számolásokhoz a koncentráció arány 0.5-5.0 széles tartományában kapott relatív intenzitások által meghatározott kalibrációs egyenest használtuk fel. A kapott koncentráció arány értékek közelebb estek az aktuális/valós értékekhez, mint azoknál a meghatározásoknál, amikor a vizsgálatokhoz nem az adott peptid stabil izotóppal jelölt származékát alkalmaztuk (**20.a: A-D, 20.b: A-B ábra vs. 15.a, 15.b ábra**). Továbbá a 95%-os konfidencia intervallum is sokkal szűkebb volt, mint az előzetes mérések során (**20.a: A-D, 20.b: A-B ábra vs. 15.a, 15.b ábra**), ami a kapott értékek megbízhatóságának jelentős mértékű javulását jelzi az adott úton történő meghatározások során. Ugyanakkor a kalibrációs egyenes szerkesztésekor szélesebb koncentráció tartomány figyelembe vétele a pontosság és a precizitás jelentős mértékű romlását eredményezte (**20.a: E-H, 20.b: C-D ábra**). Ez azt jelenti, hogy a meghatározandó minta és a standard mennyiségének különbsége csak bizonyos

szűk tartományon belül mutat lineáris regressziót és erős korrelációt, azaz ezen a keskeny tartományon belül ad, illetve adhat megbízható eredményt. Az általunk alkalmazott rendszerekben ez az adott komponensek ötszörös mennyiségét jelenti az egész kalibrációs folyamat és a kvantitatív mérések során. A fentiek ismeretében a meghatározandó komponens és a mintához adott standard közelítőleges koncentráció arányának megbecsüléséhez előzetes méréseket javaslunk a kvantitatív meghatározásokhoz.

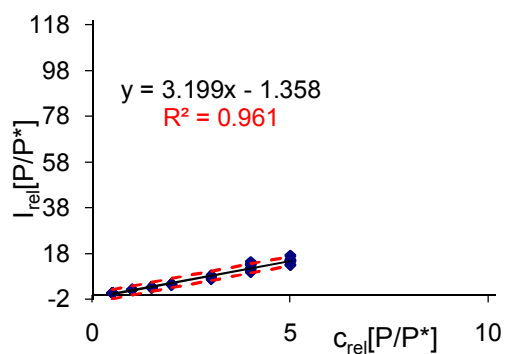


17. a

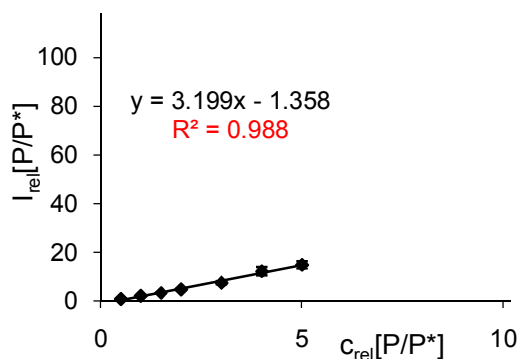


17. b

17. ábra A P és P* peptid relatív intenzitásának ábrázolása a koncentráció arányuk függvényében a $0.5 \leq c_p/c_{p^*} \leq 10$ tartományon belül. **17.a**, Minden egyes mért relatív intenzitás ábrázolása. A szaggatott vonalak az adott peptid mért relatív intenzitásainak 95%-os konfidencia határát szemléltetik. **17.b**, A relatív intenzitások középértékének ábrázolása a peptid megfelelő koncentráció arányának függvényében. A standard deviációt a hibavonalak reprezentálják. A minták adott mennyiségű P peptid és 100-100 fmol P* peptid és fetuin emésztmény keverékei.

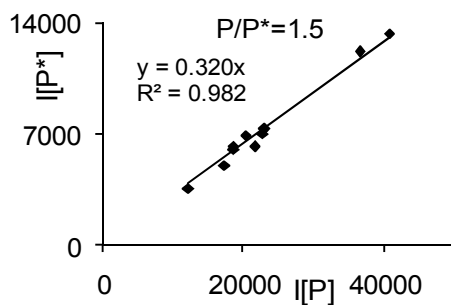


18.a

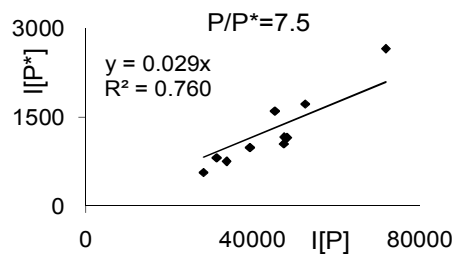


18.b

18. ábra A P és P* peptid relatív intenzitásának ábrázolása koncentráció arányuk függvényében a $0.5 \leq c_p/c_{p^*} \leq 5$ tartományon belül. **18.a**, Minden egyes mért relatív intenzitás ábrázolása. A szaggatott vonalak az adott peptid mért relatív intenzitásainak 95%-os konfidencia határát szemléltetik. **18.b**, A relatív intenzitások középértékének ábrázolása a peptid megfelelő koncentráció arányának függvényében. A standard deviációt a hibavonalak reprezentálják. A minták adott mennyiségű P peptid és 100-100 fmol P* peptid és fetuin emésztmény keverékei.



19. a

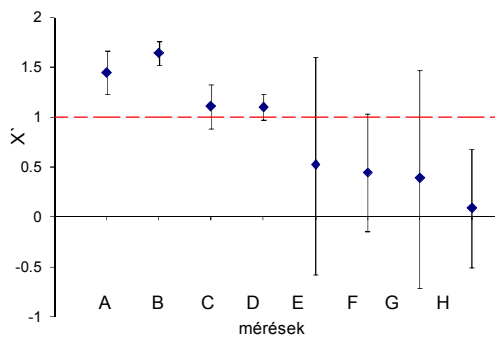


19. b

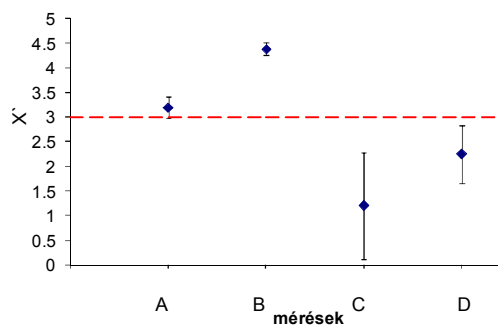
19. ábra A P és P* peptidok intenzitásai közötti korreláció vizsgálata adott mintán belül, ahol a két peptid koncentráció aránya: **19.a**, $c_P/c_{P^*} = 1.5$ és **19.b**, $c_P/c_{P^*} = 7.5$. A korrelációs egyenes szigorúan az origon átmenő egyes, mivel egyenes arányosság feltételezett.

	mintasorozat	b	s_b^2	t-próba		p
a	Fet, P, P*↑	3.1992	0.0061	t_{ab}	127.7450	$p < 0.001$
b	E. coli, Fet, P, P*↑	1.9365	0.0007			

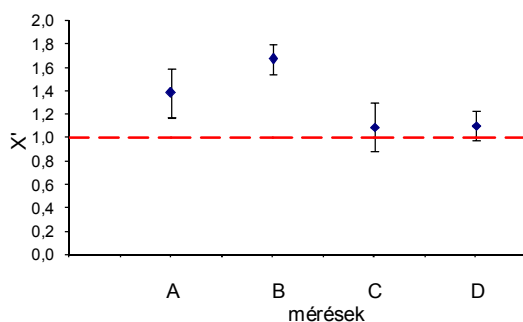
10. táblázat A molekuláris környezet hatása a kalibrációs egyenesek meredekségére. A nyilak (↑) a változó koncentrációban szereplő mintakomponenseket jelölik. s_b^2 a meredekség (b) varianciáját jelzi, p a meredekségek közötti differencia szignifikanciáját jelenti.



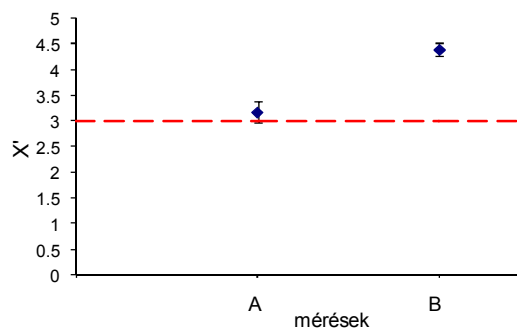
20.a



20.b



20.c



20.d

20. ábra A számolt koncentráció arányok (X') megbízhatósága stabil izotóppal jelölt származékot alkalmazó vizsgálatok esetében. A koncentráció arány (X') becslése a relatív intenzitások (y') alapján a 95%-os konfidencia határ szintjén, amit a hibavonalak reprezentálnak. A P peptid és P* peptid mennyiségét állandó értéken tartottuk: $c_P/c_{P^*}=1$ (20.a és 20.c); $c_P/c_{P^*}=3$ (20.b és 20.d). A 20.c, 20.d ábrák eredményei a nátrium addukt figyelmen kívül hagyásával számolt értékeken alapulnak. Az X' meghatározásához felhasznált kalibrációs egyenesek készítése két koncentráció arány tartományban történt: $c_P/c_{P^*}=0.5-5.0$ (mérések 20.a/A-D, 20.b/A-B, 20.c/és 20.d) és $c_P/c_{P^*}=0.5-10.0$ (mérések 20.a/E-H és 20.b/C-D). Mindegyik mintában 100 fmol fetuin emésztmény, illetve a következőknél még további 2×10^6 cfu *Escherichia coli* sejtenyészet volt jelen: 20.a/B, D, F, H, 20.b/B, D, 20.c/B, D, és 20. d/B.

2.5. Eredmények tárgyalása

2.5.1. A szuppresszió hatásának és az egyes méréssorozatok linearitásának tanulmányozása

Első körben egyedi méréssorozatok mérési eredményeit vizsgáltuk a relatív intenzitás és a relatív mennyiség összefüggésének tanulmányozására. Az egyedi intenzitás arányok koncentráció arány függvényében történő ábrázolása során kapott görbék nagy variációt mutatnak (**11.**, **12. ábra**). A görbék lefutása a tesztelt emésztmény (BSA) kiválasztott triptikus peptidjének minősége (**11.a-c ábra**) mellett a kontroll emésztmény (fetuin) referenciaként választott triptikus peptidjének jellegétől is függ (**11.a** vs. **11.b** vs. **11.c**; és **12.a,b ábra**). Jó példa erre a **12.a ábra**, ahol az állandó mennyiségben jelenlévő Arg-peptid jelének intenzitása szintén nő (állandó koncentrációja mellett) a Leu-peptid koncentrációjának növelésével. A normalizálás a fetuin $m/z=1072.60$ tömegű peptidjére történt. Az Arg-peptid intenzitásának növekedése a normalizálás során felhasznált fetuin peptidre ható szuppressziós hatás erősödésének eredménye, amely a másik szintetikus peptid koncentrációjának növekedésével fokozódott.

A beavatkozás nélkül és a vákuumban szárított minták méréseiből kapott görbék hasonló, szinte azonos eredményhez vezettek (az adatokat nem mutatjuk be).

Az alap mintasorozatoknak (Fetuin/BSA+Arg/Lys/His/Leu-peptid) különböző mátrix alkalmazásával történő mérése szintén nem változtatott az eredmények tendenciáján. A peptidek bázicitásának növekedésével általában nagyobb meredekségű görbéket kaptunk (Arg-peptid>Lys-peptid>His-peptid>Leu-peptid), ami egyetértésben van egyes korábbi munkák eredményeivel, azaz a peptidek bázicitásának növekedésével nő azok detektálhatósága (103,114-116).

Vizsgálódásunk célja az volt, hogy megnézzük, vajon egyszerű mintapreparálási módszerek alkalmazásával és bizonyos faktorok figyelembe vételével megjósolható-e, hogy mi detektálható egy elegyből. Ez az alábbi két ok miatt is fontos. Először azért, mert annak a lehetősége, hogy megjósoljuk, hogy melyik peptid detektálható egy frakcionálatlan elegyből, segíthetne bizonyos kísérletek tervezésében. Másrészt a távoli jövőben talán a peptidek pontos detektálhatósága valósággá válna. Ugyanakkor munkánk kezdetén a peptidek detektálhatósága, intenzitása és azok bázicitása és hidrofóbicitása közötti egyértelmű

összefüggést nem találtunk frakcionálatlan minták MALDI-TOF MS analízise során, ami összhangban van Tholey állításával (46). Ők szintén nem találtak nyilvánvaló, jól definiálható összefüggést a peptidek detektálhatósága és azok hossza, összetétele és ezáltal meghatározott sajátságai, mint például hidrofóbicitása, bázicitása és töltése között. A peptidek detektálhatósága valószínűleg több, eddig ismeretlen faktorok interakcióján múlik. Továbbá a kvantitatív predikciókhoz minden egyes faktort, amely a detektálhatóságot befolyásolja, és azok kölcsönös kapcsolatát ismerni kellene, ez magában foglalja a vizsgált minta pontos összetételét.

2.5.2. MALDI-TOF MS kvantitatív jellegének a tanulmányozása

A MALDI-TOF MS fehérjék kvantitatív meghatározására történő felhasználhatóságának vizsgálatára peptidek nagyszámú mérésből nyert relatív intenzitásait ábrázoltuk azok koncentráció arányának függvényében. Minden egyes peptidre vonatkozó értékeket külön diagramon tüntettünk fel (**13, M1-4 ábrák**). A mérési adatokon kalibrációs egyenes szerkesztése céljából regresszióanalízist végeztünk, ami minden esetben erősen szignifikáns ($p < 0.001$) lineáris regressziót eredményezett. Ez jól néz ki, de ugyanakkor ez az eredmény nem szolgál kielégítő információval a MALDI-TOF kvantitatív módszerként való felhasználhatóságáról (lásd alább). Ennek kifejezésére sokkal informatívabb lenne a determinációs együttható (R^2). Számos csoport a mennyiségi mérésekhez készített kalibrációs egyenes jóságát az R^2 magas értékével hangsúlyozza (45,49,51,56,58), ugyanakkor két probléma is van az efféle megközelítéssel. Az egyik a determinációs együttható értékének meghatározásából adódik: mégpedig abból, hogy a legtöbb esetben a regresszióanalízis során az adott koncentráció arányokhoz tartozó relatív intenzitások *átlagát* használják fel (45,46,49,51,56,58), ami a regressziós egyenes sokkal jobb R^2 értékét eredményezi. Ez egyértelműen látszik a **13. és 14. ábra (M-1 - M-4 ábrák vs. M-5 - M-8 ábrák)** összehasonlítása révén, amelyek azonos méréssorozatok eltérő módon történő feldolgozásának eredményeit mutatják be. A mi esetünkben az R^2 értéke 0.225 - 0.868 tartományban mozgott. Ugyanakkor ez a megközelítés, azaz az átlagolás az adatok szórásának elrejtését és a precizitás téves felbecsülését eredményezte. A fenti tényezők különösen kritikusak egy új módszer értékelésénél. A másik fő probléma az R^2 érték alacsony gyakorlati információtartalma. Az R szignifikanciájának számolását t-próba alkalmazásával végeztük el, azonban *csak a szignifikancia* meghatározása nem elég. Ez különösen igaz nagyszámú minta

esetében. Véleményünk szerint kvantitatív analitikai módszerről a leghasznosabb információt a számolt értékek konfidencia határa szolgáltatja. A mi esetünkben ez a mérési adatokból (relatív intenzitások) meghatározott koncentráció arányok 95%-os konfidencia határainak számolását jelenti. A meghatározott koncentráció arányok értékeinek a bizonytalansága a regressziós egyenes bizonytalanságára és a mérések során kapott relatív intenzitás értékek becsült értékeik körüli varianciájára vezethető vissza. Az “inverz” típusú konfidencia határ számolása (a módszerek című fejezet **2. egyenlet**) mindkét forrást figyelembe veszi (145). Ez a módszer eltér a **13. ábrán** látható “y”-hoz tartozó konfidencia határ meghatározásától. Az “inverz” 95%-os konfidencia határ bemutatása (**15. ábra**) lehetővé teszi minden egyes becsült koncentráció arány érték megbízhatóságának a meghatározását. A mi rendszerünk esetében a számolt koncentráció arányok pontossága alacsony volt (**15. ábra**). Számos esetben a valós értéktől a becsült koncentráció nagymértékben eltért (3.8 vs. 1, **15.a ábra**). A különbség mértéke természetesen a normalizálásnál felhasznált peptidtől is függ. Egyetlen esetben, az $m/z=1474.84$ fetuin triptikus peptid standardként való alkalmazása során találtuk a meghatározott értéket elfogadhatónak. Ez nagyon közel esett a valós értékhez (1.03 vs. 1, **15.a ábra**), valószínűleg az adott peptid jó és következetes detektálhatóságának köszönhetően. A széles konfidencia intervallum ($-0.76 - 2.66$) azonban valószínűleg nem tenné lehetővé ennek az eredménynek a felhasználását további számolásokhoz. Ugyanakkor a $C_{\text{Arg-peptid}}/C_{\text{Fetuin}} = 3$ esetben az előbb említett peptid standard-ként való felhasználása nem vezetett az előbbiekhöz hasonló pontos eredményhez, megkérdőjelezve így a peptid előbbieken említett általános előnyét. A nátrium addukt figyelmen kívül hagyása a pontosságot és a precizitást csak nagyon csekély mértékben módosította (pl., **20.a/A-D vs. 20.c/A-D ábra** és **20.b/A-B vs. 20.d ábra**). A vizsgált rendszerekben sem a meghatározott koncentráció arány reprodukálhatósága, sem pedig a pontossága nem volt elfogadható, egyetértésben a közelmúltban megjelent beszámolóval (90). A jelintenzitások gyenge reprodukálhatósága (sample-to-sample and shot-to-shot) jól ismert jellemzője a MALDI-TOF tömegspektrumoknak (lásd Elméleti áttekintés). Ennek a problémának a kiküszöbölésére belső standard-et alkalmaznak, amely azon a feltételezésen alapul, hogy a relatív intenzitásokat mérésről-mérésre befolyásoló hatások azonos mértékűek (arányosak) minden egyes jel esetében. Ebből következik, hogy két molekula relatív intenzitás-aránya állandó, ha a koncentrációjuk változatlan. Ennek a hipotézisnek az ellenőrzésére két, egy mintán belül állandó koncentrációban jelenlévő peptidhez tartozó jelek korrelációját vizsgáltuk meg (**16. ábra és M-9. ábrák**). Mivel lineáris arányt feltételeztünk, így a korrelációs egyenest az origón kényszerítettük át. Az így kapott egyenesekhez tartozó R^2 értékek a kilenc közül 6 esetben túl alacsonyak voltak ahhoz, hogy

szignifikáns korrelációt állapítsunk meg. Ezekből az eredményből látható, hogy az általunk alkalmazott rendszerekben a belső standard alkalmazása nem teljesítette az elvárásokat, és egyben jelzi az adatok alacsony reprodukálhatóságának egyik fő okát is. A vizsgált rendszerben alkalmazott két peptid hasonló molekulatömegű (1385.56 vs. 1046.48), de különböző összetételű volt. Számos tanulmány beszámolt már strukturális analógok (49,75) származékok (49,56,57,67), funkcionális analógok (51), a mintával hasonló hidrofóbicitású molekula (58), vagy a minta stabil izotóppal jelölt származékának (43,45,49,57) belső standardként való alkalmazásáról. Azonban csak néhány számolt be a fenti publikációk közül elég kis standard deviációval jellemezhető kalibrációs egyenesekről (45,58). Ezért a különböző belső standard használatának direkt statisztikai összehasonlítására még szükség volt, hogy bebizonyítsuk az analógok, különbözőképpen módosított, illetve stabil izotóppal jelölt származékok alkalmazásának tényleges előnyét. A mintakomponens koncentrációjának MALDI-TOF MS módszerrel történő meghatározását az általános gyakorlatban kalibrációs görbe készítésével végzik (49), amit egy változó mennyiségű meghatározandó molekulát és konstans mennyiségű másik komponenst (standard-et) tartalmazó mintasorozatból nyernek. Magát a kalibrációs görbét az adott komponensek relatív intenzitásainak ábrázolásával kapják azok koncentráció arányának függvényében. Ezután a mérendő mintához adják a „standard” molekula adott mennyiségét, majd a meghatározandó komponens és a standard mérés során kapott relatív intenzitásából határozzák meg a minta koncentrációját a kalibrációs egyenes felhasználásával. A rendszerünkre mi is elkészítettük a kalibrációs görbét, majd megismételtük a méréseket *Escherichia coli* sejtenyészet jelenlétében is, hogy a molekuláris környezet változásával szimuláljuk a kalibrációs és az aktuális mérés környezete közötti különbséget. Az eredményeinkből egyértelműen kitűnik, hogy a meghatározandó komponens és a standard együttes környezetének eltérése a kalibrációs egyenes meredekségének szignifikáns változásával jár (**8. és 10. táblázat**). Ez jelzi az ilyen jellegű külső (“external”) kalibrációs egyenesek alkalmazásának a hibáját a koncentráció arány meghatározásából, amely megállapítás összhangban van Tholey-nak és munkatársainak a megfigyelésével (46). Ennek a problémának a kiküszöbölésére számos csoport magát a mintát használja fel a kalibrációs egyenes elkészítéséhez. Ez a módszer helyes abból a szempontból nézve, hogy a kalibrációs egyenes készítése és a minta mérése azonos körülmények között történt. A fenti tanulmányok ugyanakkor elhanyagolták a mintában eredetileg jelenlévő endogén eredetű meghatározandó komponenst a kalibrációs egyenes készítése során, ami a pontosság bizonyos mértékű csökkenését eredményezhette. A kézenfekvő megoldás a kalibrációs eljárás során a minta változó komponensként való alkalmazása lenne. Az állandó koncentrációban jelenlévő

stabil izotóppal jelölt származék alkalmazása önmagában nem lenne elegendő szintén a mintában lévő endogén meghatározandó komponens figyelmen kívül hagyása miatt. Tehát, ahogy már a fentiekben is említettük, a kalibrációs egyenes elkészítésének valószínűleg az lenne a legkézenfekvőbb módja, ha mind a növekvő mennyiségű komponens, mind pedig az állandó koncentrációban jelenlévő standard egyaránt a meghatározandó komponens tömeg és szerkezeti analógja lenne, feltételezve, hogy a jel detektálását befolyásoló faktorok azonos mértékben hatnak rájuk. Az izotóppal jelölt (^2H , ^{13}C , ^{15}N) standard fehérjével, peptiddel való munka azonban újabb nehézségeket eredményezhet. Például, a nagymolekulák a hagyományos lineáris módban működő TOF analizátorral sokkal jobban detektálhatóak, ugyanakkor ebben az esetben a stabil izotóppal jelölt származékok nem különböztethetők meg egymástól az igencsak költséges többszörös jelölés alkalmazása nélkül (67). A komponensek tömegének növekedésével a metastabil bomlás, az adott jelhez tartozó izotópcsúcsok átfedésével járó növekvő csúcsszélesedés egyre nehezebbé teszi a meghatározandó komponens és a belső standard jeleinek megkülönböztetését (67). A stabil izotóppal jelölt analógok elkészítése további újabb nehézségekkel (anyagi és gyakorlati értelemben egyaránt) járhat (67). Ennek ellenére azonban valószínűleg a stabil izotóppal jelölt származékok alkalmazása lehet a legkézenfekvőbb út a megbízható eredményeket szolgáltató kvantitatív MALDI-TOF MS eléréséhez, a közelmúltban ígéretesnek tűnő RTIL technika mellett (43,46,58,91,125,126). Ugyanakkor véleményünk szerint az a fő kérdés, hogy vajon a MALDI-TOF használható-e általánosságban kvantitatív analízisre, mivel maga a technika jelentős mértékben függ minden egyes specifikus/sajátos méréstől. Ezért a mérések során kinyert adatok alapos statisztikai analízisére lenne szükség minden egyes tudományos kísérlet során. Javasoljuk a meghatározandó komponens/ek becsült koncentrációjához tartozó 95%-os konfidencia határok (alsó és felső egyaránt) meghatározását és azok bemutatását is. Így mind a kutató maga, mind pedig az olvasó is el tudja dönteni, hogy vajon a kapott tartomány elfogadhatóan keskeny-e számára, vagy sem. A konfidencia határok (alsó és felső) „széthúzása” esetén a regresszió javítható a kalibrációs egyeneshez felhasznált mérések számának (N) növelésével. Nagyszámú lézerlövés átlagolása szintén kívánatos lenne minden egyes minta (spot) esetében (93). Inhomogén minta analízise [mint például szövetminta feltérképezése, „imaging mass spectrometry”] során minden egyes koordináta esetében szintén nagyszámú ismételt mérést kívánna meg. Egy mintán belül a peptidek (komponensek) relatív intenzitásai és koncentráció arányaik közötti korreláció javítható stabil izotóppal jelölt származék alkalmazásával, amint már említettük. Összetett minták esetében a komponensek egymásra hatása komplex interferenciaként jelentkezhetnek, így a kvantitatív mérések

kivitelezése egyszerű, csak néhány komponenst tartalmazó mintáknál célszerű (93). A meghatározandó minta szélsőséges mennyisége a standard koncentrációjához képest a jóval kisebb mennyiségben jelenlévő peptid jelének teljes szuppresszióját eredményezheti (93), ami jelzi a megfelelő kísérlettervezés fontosságát. Az inverz konfidencia határ nemcsak a kalibrációs egyenes meghatározásához szükséges mérések számának növelésével, hanem az ismeretlen mennyiségű (koncentráció arányú, X') komponenst tartalmazó minta mérésszámának (N') növelésével is szűkíthető. Sokkal pontosabb és megbízhatóbb adatok kinyeréséhez a jelintenzitásokat befolyásoló molekuláris mechanizmusok, illetve faktorok sokkal mélyebb, részletesebb ismeretére lenne szükség. Addig is a MALDI-TOF mérésekből nyert kvantitatív adatokat elővigyázatosan kell kezelni.

A kalibrációs egyenes készítése során a stabil izotóp származékok standardként való alkalmazása a precizitás (reprodukálhatóság) drámai növekedéséhez vezet, de ezzel szemben a pontosság jóval kisebb mértékű javulását eredményezi. Ugyanakkor az eredményeink azt is jelzik, hogy a linearitás csak bizonyos szűk tartományon belül áll fenn, ami a kvantitatív meghatározások során előzetes méréseket tesz szükségsszerűvé a mennyiség közelítőleges becslésére.

3. Poszt-transzlációs módosítás vizsgálata

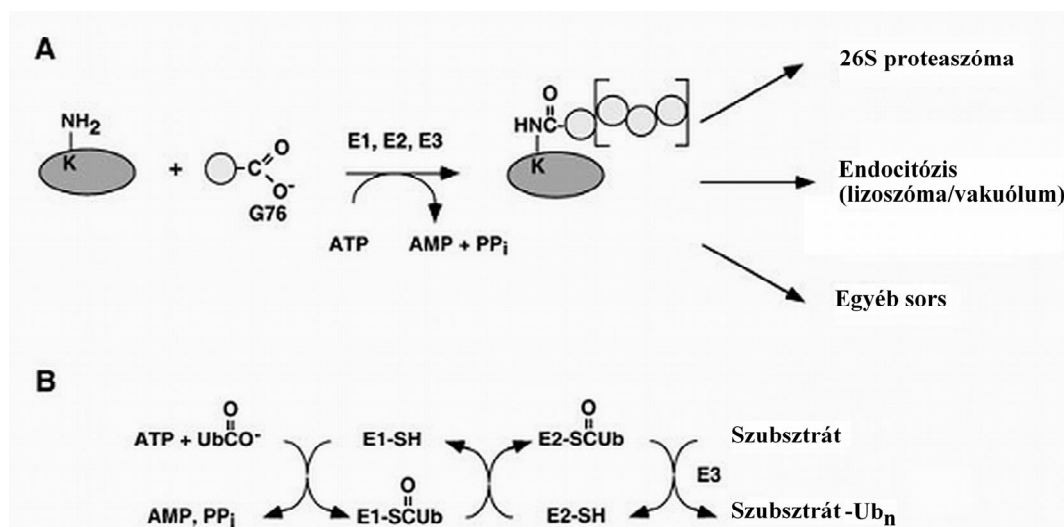
3.1. Elméleti áttekintés

Munkám során bizonyos fehérjék poszt-transzlációs módosításának, ubiquitinálásának vizsgálatával is foglalkoztam. Az ubiquitin jelzőrendszer és a proteaszóma felfedezése vezetett arra a következtetésre, hogy a legtöbb celluláris fehérje lebontásáért egy nem lizoszómális mechanizmus tehető felelőssé (1980) (149-151), amiért Aaron Ciechanover, Avram Herskho és Irwin Rose megosztott kémiai Nobel-díjat kapott (2004). Az ubiquitin szignálrendszer és a proteaszóma felfedezése egy új érdekes kutatási terület megszületését eredményezte. Az utóbbi ~ 15 évben további ubiquitin-típusú módosító fehérjéket (UBLs, ubiquitin-like modifiers) fedeztek fel, mint például a Nedd8 (RUB, related to ubiquitin), a SUMO (small ubiquitin-like modifier protein), az ISG15 (interferon-stimulated gene 15).

Az ubiquitin (**ubiquitin**: NCBI#: [gi|51703339](#), LOCUS [P62988](#)) egy kis, hőstabil, evolúciós szinten erősen konzervált fehérje, amelynek szekvenciája a következő:

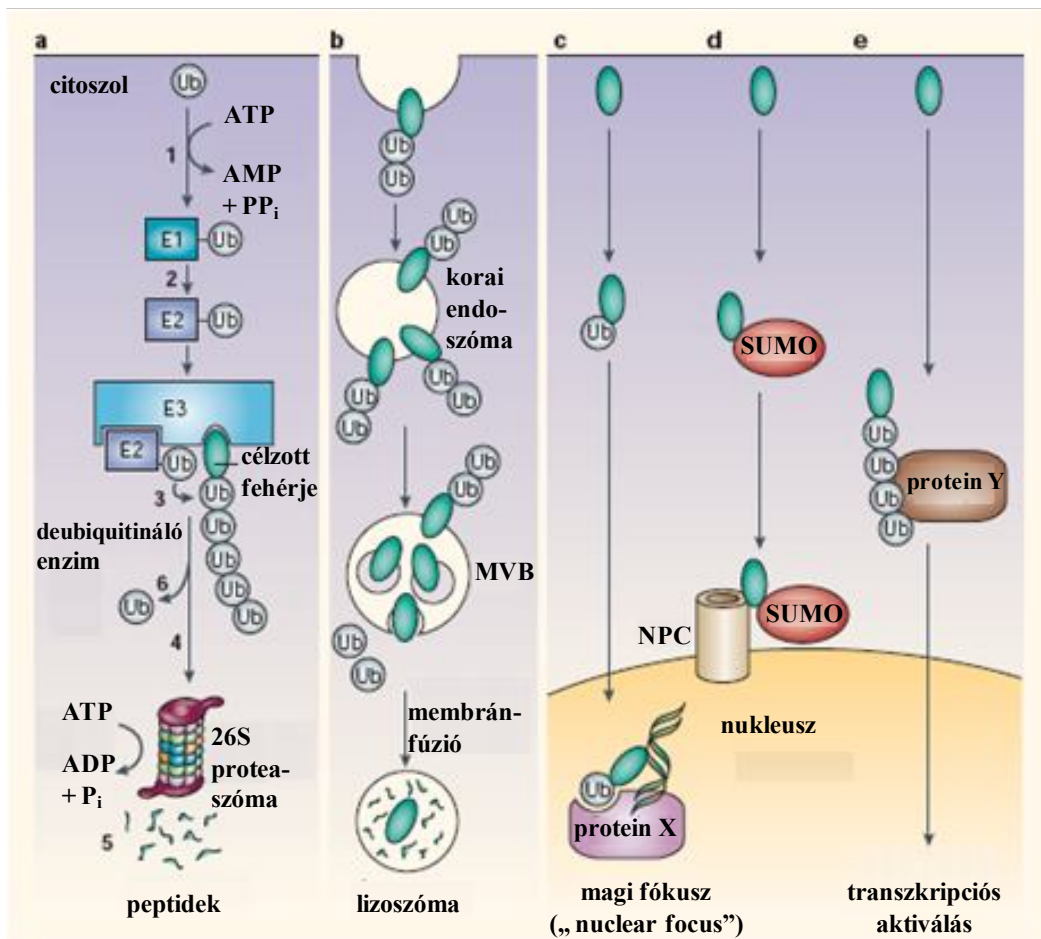
MQIFVKLTG KTITLEVEPS DTIENVKAKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL EDGRTLSDYN
IQKSTLHLV LRLRGG

A fehérjék ubiquitinálása egy háromlépcsős folyamaton keresztül történik, amely során általában az ubiquitin C-terminálisa (**G76**) és a módosított fehérje egy vagy több Lys ϵ -aminocsoportja között alakul ki a peptidkötés (**21. ábra**). Az ubiquitináláshoz 3 enzim egymást követő működése szükséges. Az alábbiakban részletezett folyamat indítja el az összes típusú ubiquitinálási reakciót attól függően, hogy a szubsztráthoz kötött ubiquitin(ek) milyen folyamatot jeleznek: proteaszómához kapcsolt proteolízist, endocitózist, vagy más egyéb utat (**21. ábra/A**). Az első lépésben az ubiquitin C-terminálisának aktiválása történik a nukleofil támadáshoz az ubiquitin-aktiváló enzim révén (E1) (**21. ábra/B**). Az első lépés során tehát az E1 tioészterkötést alakít ki az ubiquitin G76 karboxil-csoportjával energia felhasználás révén, amit az adenozin trifoszfát (ATP) biztosít. Ezt követi az ubiquitin-konjugáló enzimre történő szállítása (E2), amely nagyenergiájú E2-ubiquitin intermediér kialakulását eredményezi. A harmadik lépésben az aktivált ubiquitin egység továbbítása történik az E2 enzimről az ubiquitin ligázhoz (E3) kapcsolódó szubsztrát/ubiquitin Lys oldalláncához.



21. ábra Ubiquitinálás által beindított folyamatok (A) és az összes típusú ubiquitinálási reakciót elindító háromlépcsős folyamat (B) Az ubiquitináláshoz 3 enzim egymást követő működése szükséges: **1.** Ubiquitin C-terminálisának aktiválása a nukleofil támadáshoz az ubiquitin-aktiváló enzim révén (E1). Az E1 tioészterkötést alakít ki az ubiquitin G76 karboxil-csoportjával energia felhasználás révén, amit az adenozin trifoszfát (ATP) biztosít. **2.** ubiquitin-konjugáló enzimre történő szállítása (E2), amely nagyenergiájú E2-ubiquitin intermedier kialakulását eredményezi. **3.** Az aktivált ubiquitin egység továbbítása az E2 enzimről az ubiquitin ligázhoz (E3) kapcsolódó szubsztrát/ubiquitin Lys oldalláncához. (152)

Az ubiquitin és az ubiquitin-szerű fehérjék által történő poszt-transzlációs módosításoknak azonban eltérő funkciója lehet (szerepet játszhatnak a proteolízisben, a sejtmagi lokalizációban, a kromatin szerkezetének kialakításában, genetikai épség és a proteinek minőségének ellenőrzésében és a fehérjék jelzésében (153,154), amelyek közül néhányat a **22. ábra** mutat be. Az általunk vizsgált monoubiquitinált fehérjék a **22. c ábra** folyamatba tartoznak.



22. ábra Az ubiquitinálás és az ubiquitin típusú fehérjék néhány szerepe. **a,** A proteaszómahoz kapcsolt celluláris fehérjedegradáció. **b,** A mono- és oligo-ubiquitinálás célja a membránfehérjék lizoszómában történő degradációja. **c,** A mono-ubiquitinálásnak, vagy a mono-sumoilálásnak (**d**) (SUMO) célpontjai lehetnek a fehérjék azért, hogy megkülönböztessenek szubcelluláris célpontokat, rendeltetési helyeket. Ilyen például a magi fókusz („nuclear foci”), amely Protein X-et tartalmaz a fenti ábrán, vagy a nukleáris pórus komplex: NPC). Az ubiquitin-szerű fehérjék okozta módosításoknak további non-proteolitikus funkciói is lehetnek (fehérje megvédése az ubiquitinálódástól, vagy az E3 enzim aktiválása). **e,** Poliubiquitin lánc keletkezése direkt és indirekt módon egyaránt tudja aktiválni a transzkripció regulátort. Non-proteolitikus funkció esetén az ubiquitin polimerizációja az ubiquitin egység egy belső lizin oldalláncán történik (pl., a Lys63-on történő ubiquitinálás), ami különbözik a proteolízishez vezető Lys48-on történő módosítástól. (151)

Mivel az ubiquitinálásnak számos következménye lehet, ezért további faktoroknak kell lenniük, amelyek az ubiquitinálási jelzést befolyásolják. Ilyen tényező lehet például a szubsztrát szubcelluláris (sejten belüli) lokalizációja, vagy a szubsztráthoz kötött ubiquitinek száma és elhelyezkedése (152,155). Például, a proteaszómába irányított szubsztrátokhoz általában poliubiquitin lánc kötődik, amelyben az egymást követő ubiquitinek közötti

izopeptid kötés a K48-G76 aminosavak között jön létre (156). Ugyanakkor, ha a láncok a K63-G76 kötéseken keresztül épülnek fel, akkor túlnyomó részben a nem-proteolitikus jelzésben vesznek részt (157-160).

3.2. Célkitűzés

A vizsgálatok során első körben a módosítás tényének bizonyítása, majd amennyiben lehetséges a poszt-transzlációs módosítás pontos helyének meghatározása volt a cél. Mivel az ubiquitinálást tartalmazó peptid nem mutat speciális fragmentációt, illetve az ubiquitinálási hely meghatározása során nem áll rendelkezésre speciális dúsítás, ezért a vizsgált fehérjéket SDS-PAGE-en való tisztítást követően, gélben emésztettük, majd az emésztési termékek on-line vagy off-line frakcionálásával, illetve a rendelkezésre álló alternatív ionizációs technikák használatával igyekeztünk minden komponenszt detektálni, és a tripszines emésztés után a Lys-oldalláncon visszamaradó Gly-Gly [GG], illetve kihagyott triptikus hasítóhely esetében Leu-Arg-Gly-Gly [LRGG] módosítást azonosítani. Modell rendszereink: *Homo sapiens*: DNS polimeráz α (NCBI#: [gi 7533183](#), LOCUS [AAF63383](#)), DNS polimeráz β (NCBI#: [gi 57209081](#), LOCUS [CAI42642](#)), Werner helicase interacting protein (ATPase WRNIP1, NCBI#: [gi|18426902](#); LOCUS [NP_064520](#)), és *Saccharomyces cerevisiae* Rad5 protein (NCBI#: [1360348](#), LOCUS [CAA97556](#)) Dr. Haracska Lajos csoportjával együttműködésben.

3.3. Kísérleti rész

3.3.1. Vegyszerek és egyéb felhasznált anyagok:

A Scharlau által forgalmazott HPLC tisztaságú acetonitril (ACN). A Sigma-Aldrich társaságtól (Németország) rendelt ditiotreitolt (DTT), jódiacetamid (IAM), ammónium-bikarbonát (NH_4HCO_3), trifluorecetsav (TFA), hangyasav (FA). Nagytisztaságú (sequencing grade) oldalláncon redukzív metilációval módosított sertés tripszin (Promega, Madison, WI), Millipore ZipTip_{C18} (Billerica, MA, USA). Az emésztési procedura során alkalmazott pipettahegyek a műszer kalibrálásához alkalmazott standard peptidek és a minta targetre felvitele során használt mátrixok, illetve a munka során felhasznált mikrocentrifuga csövek

megegyeznek a kvantitatív mérések során alkalmazottakkal, lásd ott. Az ubiquitinált fehérjeminták Dr. Haracska Lajos csoportjából származtak, együttműködés révén. Előállításuk és kinyerésük leírása a mellékletben található.

3.3.2. Mintaelőkészítés

Gélben emésztés általános menete

A fehérjék tömegspektrometriás analízisét megelőző tripszines emésztés menete:

- I. a munkaterület keratinmentesítése és a felhasználandó friss oldatok készítése
- II. redukálás és alkilálás (1D gél minta esetében feltétlenül szükséges)
- III. emésztés
- IV. a peptidek extrakciója a gélből
- V. a minta fordított fázisú ZipTip tisztítása, amennyiben szükséges

I. A munkaterület keratinmentesítése és a felhasználandó friss oldatok készítése:

Az emésztések során a következők frissen készített oldatokat használtam:

25 mM ammónium-bikarbonát (100 mg/ 50 ml H₂O)

25 mM ammónium-bikarbonát/ 50% ACN/ 50% H₂O

50 % ACN/ 2% hangyasav

5 ng/μl tripszin/ (25 mM ammónium-bikarbonát/ H₂O), amely közvetlenül a felhasználása előtt készült.

A – 20 °C-on tárolt tripszin törzsoldat (1 μg/μl) készítése 1 mM TFA vizes oldatának felhasználásával történt.

Minden egyes gélsíkot kis darabokra történő feldarabolását követően háromszor 10 percig 25 mM ammónium-bikarbonát 50%/ ACN pufferben mostuk.

II. Redukálás és alkilálás:

A diszulfidhidak felnyitására az 1D gélekben a fehérjék redukálása és alkilálása célszerű az emésztést megelőzően, míg a 2D gélek esetében ez már nem szükséges az előzetes (2D gél futtatása során már megtörtént) redukálás és alkilálás miatt. A fehérje

redukálása ditiotreitól hozzáadását követően 56°C-on történt. Majd a fehérje alkilálása jódiacetamid hozzáadása után sötétben ment végbe. Végül a minta ammónium-bikarbonát pufferben történő mosása és beszárítása történt.

III. Emésztés:

A teljesen beszáradt géldarabokhoz 20 µl (0.1µg) tripszin oldatot adtunk, majd rehidratáltuk 4°C-on. Ezt követően a minták emésztése 4h keresztül 37°C-on ammónium-bikarbonát pufferben történt. Az emésztés leállítását 2% FA/50% ACN oldattal végeztük.

IV. Peptidek extrakciója a gélből:

Az emésztmény felülúszójának kinyerése, majd az emésztmény 2* 50% ACN/1% FA oldattal történő extrakciója a gélből. Végül a minta beszárítása történt (~10, illetve -az LC/MS mérések esetében- ~ 20 µl).

V. A minta Zip-Tip tisztítása MALDI-TOF analízis előtt, amennyiben szükséges:

A ZipTip_{C18} pipetta hegy 0.1 % FA/50% ACN oldattal történő mosását követően a ekvilibrálás 0.1 % FA oldattal történt. A minta felkötését követően a minta mosása szintén 0.1 % FA oldattal, a minta eluálása pedig 0.1% FA/50% ACN oldatba történt.

brómcianidos kémiai hasítás:

A CNBr-os reakciót gélminták esetében a Coomassie Brilliant Blue festett minták szintelenítése és beszárítása előzte meg a fentiekben már ismertetett módon. Egy nagyobb, vagy két kisebb CNBr kristályt 400 µl 70% TFA oldatban oldottam fel, majd 100-100 µl-t adtam az egyes mintákhoz. A reakció 24 órán keresztül sötétben történt. A minták beszárítása HPLC tisztaságú vízzel 500 µl-re való kiegészítését követően, vákuumban történt. Majd a mintákat még 3x felvettem 500 µl vízben és beszárítottam, hogy megszabaduljunk a maradék brómciantól.

3.3.3. A tömegspektrometriás mérések kivitelezése

MALDI-TOF mérések

A mérésekhez a laboratóriumban rendelkezésre álló SCOUT 384 ionforrással és pulzáló nitrogén lézerrel (337nm) felszerelt Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométert (Bruker Daltonics, Karlsruhe, Germany) használtam. A mérési paraméterek és a műszer kalibrálása a MALDI-TOF kvantitatív jellegének a tanulmányozása során végzetten megegyezett, lásd ott. Ugyanakkor a fehérjék azonosítása során nem volt szükség 1000 lézerlövés összegzésére és a minta felvitele során DHB mátrixot alkalmaztam.

HPLC-MS mérések Agilent XCT plus ioncsapda készüléken

A minták LC-MS/MS analízise Agilent XCT plus ioncsapda készüléken pozitív ionmódban történt. A peptidok Agilent 1100 nanoLC rendszerrel történő frakcionálása során az eluent a tömegspektrométerbe vezetve adatfüggő, vagy úgynevezett információfüggő módban történt az adatgyűjtést (data-dependent acquisition mode, information-dependent acquisition mode). Az analízisek során a minta 5 µl-ét (negyedét) injektáltam. A frakcionálás a következő körülmények között ment végbe. A minta **A** eluens (0.1 %FA/H₂O) 10 µl/perces áramlási sebessége mellett az előoszlopra (Zorbax, C₁₈, 0.3 mm × 5 mm) való injektálása 5 percen keresztül történt, amit az 5 % **B** (0.1 %FA/ACN) /95% **A** eluens-összetétel mellett 15 percen keresztül ekvilibrált fordított fázisú frakcionáló oszlopon (Zorbax, C₁₈, 75 µm × 150 mm) történő elválasztása követte 300 nl/perces áramlási sebesség alkalmazása mellett. Az LC-MS/MS analízisek gradiensének paraméterei az **11. táblázat**ban szerepelnek.

A		B	
idő/perc	oldószer B/% (rövid)	idő/perc	oldószer B/% (hosszú)
0.0	5.0	0.0	5.0
5.0	5.0	5.0	5.0
21.0	45.0	80.00	45.0
22.0	90.0	100.00	65.0
25.0	90.0	101.99	65.0
26.0	5.0	102.00	90.0
		104.00	90.0
		105.00	65.0
+15.00	5.0	+15.00	5.0

11. Táblázat Az Agilent 1100 LC rendszer - XCT plus ioncsapda készüléken végzett rövid és hosszú LC-MS/MS mérések gradiensének paraméterei.

LC-MALDI-TOF mérések

Az LC-MALDI-TOF mérés az Agilent 1100 nanoHPLC rendszerrel és a Bruker Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométeren történt. A kromatográfia során a dolgozatban szereplő rövid gradienst alkalmaztunk. A HPLC során eluálódó mintához egy T-illesztésen keresztül vezettük be a DHB mátrix oldatát. A mátrix adagolását infúziós pumpával szabályozott fecskendővel biztosítottuk. A mintát az adagoló percenkénti léptetésével gyűjtöttem a MALDI targetre. A MALDI-TOF mérések a fentiekben megadott mérési paraméterek mellett történtek.

3.3.4. A mérési adatok kinyerése és feldolgozása

MALDI-TOF mérések

A tömeglista kinyeréséhez az X-ToF (version 5.1.5.), illetve a flexAnalysis (version 2.0) software-t használtam. A tömeglistából a nátrium adduktokat és a tripszin autolízisének termékeit töröltem. A minta ellenőrzésére, azaz hogy a rekombinánsan kifejeztetett fehérje valóban a kívánt molekula, illetve a szennyező fehérjék meghatározására adatbázislekeresést végeztem az NCBI-n adatbázisában (National Center for Biotechnology Information non-redundant database), a világhálón elérhető MatrixScience programcsomagjával (<http://www.matrixscience.com/>), illetve a ProteinProspector programcsomagjával (http://prospector2.ucsf.edu/pp_bin/batchtag/form) (version 4.23.4). A peptidok molekulásúlyánál a monoizotópos tömegeket ± 200 ppm pontosságon belül vettem figyelembe, a fragmentációs spektrumok (PSD) esetében a fragmens ionokra megengedett hiba ± 1 Da volt. Csak triptikus hasítást, maximum két kihagyott hasítást vettem figyelembe. Az adatbázis lekeresések során állandó módosításként a karbamidometilezett ciszteint, míg lehetséges módosításként az N-terminális Gln piroglutaminsavvá alakulását, metionin oxidációját és a fehérje N-terminálison történő acetileződését definiáltam a lekeresési paraméterek között. A fehérjék azonosító száma (Acc#) mellett a LOCUS-t adtuk meg a redundancia csökkentése érdekében, ami gyakran az azonos aminosav szekvencia adatbázisban lévő többszörös (különböző Acc#) szerepléséből ered, illetve olyan szekvenciák jelenlétéből, amelyek csak 1-2 pozícióban különböznek egymástól. Ezek a szekvenciák jelenthetnek izoformát, de szekvenálási hibát is.

LC-MS/MS mérések:

Az adatok kinyeréséhez a DataAnalysis software-t (DataAnalysis for LC/MSD Trap Version 3.2 (Build 121), Bruker Daltonik GmbH) használtam. Ezen belül a spektrumok feldolgozásához a mérésnek megfelelő script-et alkalmaztam.

Az adatbázis-lekeresést az NCBI adatbázisban, a világhálón elérhető MatrixScience programcsomagjával (<http://www.matrixscience.com/>) és az UCSF ProteinProspector programcsomagjával [http://prospector2.ucsf.edu/pp_bin/batchtag/form: Batch-Tag, illetve a már továbbfejlesztett Batch-Tag Web: <http://prospector2.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=batchtagweb>; az NCBI adatbázis 2006.10.19-én, a SwissProt 2006.10.17-én, illetőleg 2008.01.02-án (az utóbbinál)], illetve a SpectrumMill in-house adatbázis szerverrel (2007.05.02-án frissítve) végeztem el. A Batch-Tag lekeresés figyelembe veszi a lehetséges ubiquitinálást (peptid+GG), a SpectrumMill adatbázis szerver esetében pedig mind a GG (+114 Da), mind pedig a kihagyott hasítóhely esetében lehetséges LRGG (+383 Da) módosításokat is definiálni tudtuk a lekeresés során. A Batch-Tag Web alkalmazásakor az elsődleges lekeresés során meghatározott fehérje/fehérjék tovább vizsgálhatók. Ez azt jelenti, hogy az adatokon további lekeresést végezhetünk, de már csak az adott fehérjét/fehérjéket figyelembe véve. Ugyanakkor további paraméterek beállításával, illetve módosításával az adatok részletesebb, mélyebb feldolgozását teszi lehetővé az adott fehérjékre összpontosítva. Például a mi esetünkben, a poszt-transzlációs módosítás helyének feltérképezése során, a mérési adatok további feldolgozása már a lehetséges módosítások számának, típusának növelésével, illetve az ezek által okozott tömegkülönbség szélesebb tömegtartományának figyelembe vételével történtek. Az adatbázis-lekereséseket több programmal végeztem el, mivel az azonosított fragmensek más pontszámot kapnak a különböző lekereső algoritmusokban, továbbá az értékelést elősegítő E-értéket is különböző módon kalkulálják a különböző programok (így a szekvencia lefedettségben eltérés lehetséges). A molekulasúly meghatározásán alapuló adatbázis lekeresés során minden egyes fehérje, az MS/MS adatbázis lekereséskor pedig minden egyes peptid pontszámához hozzárendel a lekeresés egy E-értéket. Ez az érték azoknak a véletlenszerű találatoknak a számát fejezi ki, amelyek a detektált tömegeket ugyanolyan jól, vagy még jobban megmagyarázzák. Az adatbázis lekeresések során mi 95%-os szignifikancia szinten, azaz $p=0.05$ szinten dolgozunk. Minél alacsonyabb az E-érték, annál szignifikánsabb a pontszám, azaz a találat. Amennyiben például a pontszám tízszeresére nő, az E-érték tizedére csökken.

Az ubiquitinálási hely meghatározására irányuló további megközelítések:

1. Készítettem egy komplett listát, ami tartalmazta a vizsgált fehérje minden olyan peptidjét, amelyik a) egy oldalláncán módosított láncközi lizint (tripszin nem hasít az acilált aminosav után) tartalmazott b) más kihagyott hasítási helyet nem tartalmazott. Mindegyik peptid esetében az ubiquitin triptikus hasítása során a Lys oldalláncon maradó GG módosításnak megfelelő tömegkülönbséget (+114 Da) figyelembe véve meghatároztam azokat az m/z értékeket, amelyek ezeknek a potenciális ubiquitinált peptideknek a +2, +3, +4 töltésű ionjainak felelnének meg. Ezeket az adatokat a Juhász Márton biológus szakdolgozó diákunk által készített program segítségével összehasonlítottuk azokkal a prekursor ionokkal, amelyekről az LC-MS/MS során CID-spektrumok készültek. Az egyeztetésnél ± 1 Da tömegtartományt vettünk figyelembe. A program által (az összehasonlítás során) meghatározott tömegekhez rendelhető peptidek szekvenciájának fragmentálódását összevettem az adott tömegű peptidről felvett CID-spektrummal, azaz megnéztük, hogy rá illeszthető-e a peptid. Az adatok manuális ellenőrzésére több ok miatt is szükség van: a) a csúcslista-készítő programok torzíthatják az adatokat b) elvethetnek spektrumokat, ha kevés csúcs van bennük (ami azért jellemző lehet egy szekvenciára, ha tudjuk a szekvenciát). Továbbá a fragmentációs spektrum felvétele során két prekursor is belekerülhet ugyanabba az ablakba, ami a két peptid fragmenseinek összekeveredését eredményezi a fragmentációs spektrumban. Amikor ezzel a munkával foglalkoztunk még egy szoftver sem tudta ezt kiszortírozni, de várhatóan az új Prospector már képes lesz rá.
2. Mivel az LC-MS/MS analízis során a komputer választotta ki a prekursor ionokat fragmentációra a megadott paraméterek alapján, ezért számolni kellett azzal, hogy a módosítást tartalmazó peptid ugyan jelen volt, de nem készült belőle MS/MS spektrum. Így a továbbiakban utánamentem azoknak a tömegeknek, amiket csak a tömegmérés során detektáltunk (**23. ábra**). Először 1 illetve 2 percenként összegeztem az MS spektrumokat (SumMS), majd az így kapott spektrumokból a többszörösen töltött csúcsokkal foglalkoztam. A detektált jelek tömegéből és töltéséből a Microsoft Office Excel program segítségével meghatározott tömegeket (MH^+) a vizsgált fehérjéhez és az ubiquitinhez rendeltem a ProteinProspector (MS-Fit) alkalmazásával (**A**). Amennyiben egyéb szennyező fehérje volt jelen a mintában, azt is figyelembe

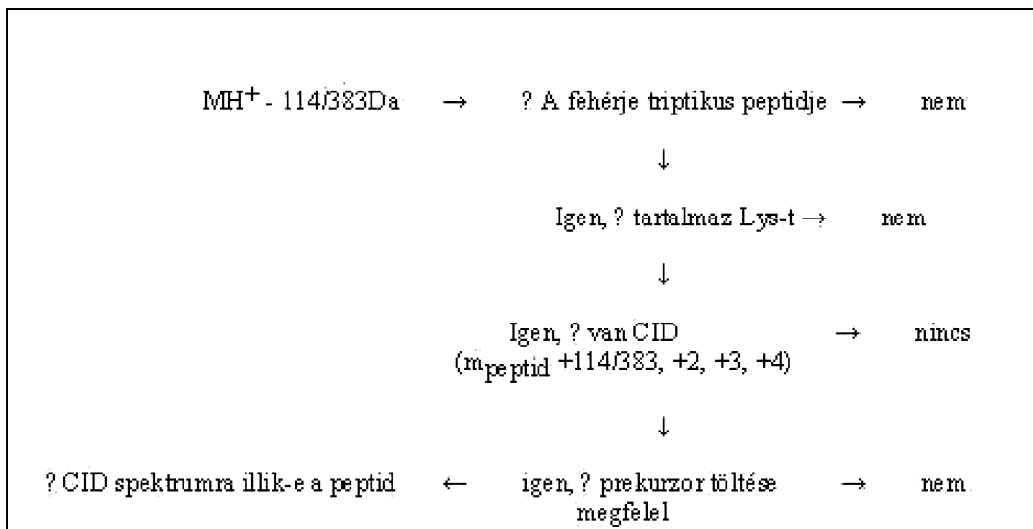
vettem az adatok értelmezésénél. Mindazokat a tömegeket, amelyek nem egyeztek a szóba jöhető triptikus peptidekkel, tovább vizsgáltam (**B**): a töltés és a detektált tömegből meghatározott MH^+ értékből kivontam a *GG/LRGG* szakaszoknak megfelelő tömeget, azaz 114, illetve 383 Da-t. Majd megnéztem, hogy van-e ezeknek a tömegnek megfelelő triptikus peptidje a vizsgált fehérjének. Abban az esetben, ha volt és tartalmazott láncközi Lys-t, akkor megnéztem, hogy készült-e ebből a komponensből CID spektrum. Amennyiben volt, először ellenőriztem a prekursor ion töltését, majd ha ez megfelelt a vártnak, akkor tovább vizsgáltam a fragmentációs spektrumot, hogy megmagyarázható-e az adott peptid szerkezetével, az ubiquitinálás helyét is beleértve. A többszörösen töltött ionok m/z értékének meghatározásához szintén a Microsoft Office Excel programot alkalmaztam.

3. Végül megismételtem az LC-MS/MS analízist úgy, hogy CID-spektrumot csak előre meghatározott peptidekről vett fel a készülék: az LC-MS-spektrumokból azokat a peptideket (tömegeket) választottam ki, amelyeket triviálisan nem tudtunk megmagyarázni, és a +114 Da tömegkülönbséget figyelembe véve ráillettek a vizsgált fehérje egy triptikus, láncközi lizint tartalmazó darabjára. Ezeknek a peptideknek a +2, +3, +4 töltésállapotainak megfelelő tömegeit tápláltam be abba a táblázatba (inclusion list), amely arra utasítja az a készüléket, hogy az LC-MS/MS analízis során preferenciálisan ezekről a tömegekről készüljenek fragmentációs spektrumok.

A **Werner helicase interacting protein 1** ubiquitinált minta első LC-MS/MS analízis [SZE_MGS1, 20070507] feldolgozása a 2. pontban leírtak szerint történt. Ezt követően a fehérje ubiquitinálási helyének meghatározására, illetve a szekvencia lefedettségének növelésével a lehetséges poszt-transzlációs módosítást tartalmazó Lys aminosavak leszűkítésére a további méréseket végeztem el:

- I. újabb LC-MS/MS analízis [SZEMGS1H, 200070508], ahol a folyadékkromatográfia során a gradiens idő hosszabb volt, mint az első mérés esetében (**11. Táblázat, B**).
- II. LC-MALDI-TOF mérések a fehérje lefedettségének növelése érdekében.
- III. LC-MS/MS analízis egy nagyobb érzékenységgű lineáris ioncsapda (Thermo LTQ) készüléken (München, Dr. Hunyadi-Gulyás Éva).

Az analízis [SZEMGS1H, 20070508] során kapott fragmentációs spektrumok feldolgozása a **script: 6-100** alkalmazásával történt. A **Script: 6-100** használata során a mérés 6-100 perce között felvett CID spektrumok közül a legjobb 300 került feldolgozásra a meghatározott paraméterek mellett. Mivel az on-line Mascot alkalmazásával történő adatbázis-lekeresések egyszerre csak 300 CID spektrummal dolgoznak, a mérés feldolgozása több lépésben (4) is megtörtént, hogy növeljük az adott mérés során figyelembe vett fragmentációs spektrumok számát és ezáltal az ubiquitinálási hely meghatározásának lehetőségét. Tehát az LC-MS/MS analízis négy script-tel történő feldolgozása során minden egyes script a mérés eltérő részéből (időre vonatkozólag, 6-40, 40-50, 50-60 és 60-105 percnél) extrahálta ki a legjobb 300-300 CID spektrumot. Így 4*300 CID spektrumot vett figyelembe az adatbázis lekeresés során, illetve a további feldolgozás közben ezzel az 1200 fragmentációs spektrummal történt a vizsgálódás.



23. ábra Az LC-MS/MS mérések során kapott adatoknak további feldolgozása az adatbázis lekeresést követően: a hosszú LC-MS/MS futás során készült MS szken során kapott MS spektrumok 1, 2 ill. 5 percenkénti összegzését [Σ (MS szken)] követően az ubiquitinre, az adott fehérjére és a jelenlévő szennyező fehérjére nem illeszthető csúcsok további vizsgálatának menete.

3.4. Eredmények

Az általunk alkalmazott rendszerekben (*Homo sapiens*: DNS polimeráz ióta, DNS polimeráz éta és Werner helicase interacting protein, illetve *Saccharomyces cerevisiae* Rad5p) az ubiquitinálás ténye beigazolódott. A minták analízise során minden esetben detektáltuk az ubiquitint és a következő peptidekről készült fragmentációs spektrum:

DNS polimeráz ióta esetében:

Az ubiquitin lefedettsége 60%:

1 MQIFVKTLTG K**TITLEVEPS DTIENVK**AKI QDKEGIPPDQ Q**R**LIFAGK**Q**L
51 EDGR**TLSDYN IQ**ESTLHLV LRLRGG

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Miss	Score	Peptide
324.8200	647.6254	647.4006	0	32	R.LIFAGK.Q
383.3400	764.6654	764.4254	0	38	-.MQIFVK.T
534.4200	1066.8254	1066.6135	0	59	K.ESTLHLVLR.L
541.4100	1080.8054	1080.5451	0	52	R.TLSDYNIQK.E
762.5000	1522.9854	1522.7739	1	48	K.IQDKEGIPPDQQR.L
596.7500	1787.2282	1786.9200	0	(36)	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
894.6600	1787.3054	1786.9200	0	50	K.TITLEVEPSDTIENVK.A

DNS polimeráz éta mintában:

Az ubiquitin lefedettsége 69%:

1 MQICVKTLTG K**TITLEVEPS DTIENVK**AKI QDKEGIPPDQ Q**R**LIFAGK**Q**L
51 EDGR**TLSDYN IQ**ESTLHLV LRLRGG

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Miss	Score	Peptide
324.7900	647.5654	647.4006	0	29	R.LIFAGK.Q
534.5400	1067.0654	1066.6135	0	78	K.ESTLHLVLR.L
541.3800	1080.7454	1080.5451	0	44	R.TLSDYNIQK.E
508.6600	1522.9582	1522.7740	1	40	K.IQDKEGIPPDQQR.L
596.7500	1787.2282	1786.9200	0	77	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
894.7100	1787.4054	1786.9200	0	(69)	K.TITLEVEPSDTIENVK.A

Rad5p fehérjénél:

Az ubiquitin lefedettsége 41%

1 MQIFVKTLTG K**TITLEVEPS DTIENVK**AKI QDKEGIPPDQ Q**R**LIFAGK**Q**L
51 EDGR**TLSDYN IQ**ESTLHLV LRLRGG

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Miss	Score	Peptide
324.7300	647.4454	647.4006	0	36	R.LIFAGK.Q
383.2600	764.5054	764.4254	0	40	-.MQIFVK.T
391.2600	780.5054	780.4204	0	(27)	-.M(O)QIFVK.T
356.5600	1066.6582	1066.6135	0	38	K.ESTLHLVLR.L

Werner helicase interacting protein esetében:

Az ubiquitin lefedettsége 84%:

1 MQIFVKLTG KTITLEVEPS DTIENVKAKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL
51 EDGR~~TLSDYN~~ IQKESTLHLV LRLRGG

Observed	Mr(expt)	Mr(calcd)	Miss	Score	Peptide
324.6000	647.1854	647.4006	0	35	R.LIFAGK.Q
520.1600	1038.3054	1038.5094	0	35	K.EGIPPDQQR.L
534.2200	1066.4254	1066.6135	0	65	K.ESTLHLVLR.L
541.2200	1080.4254	1080.5451	0	51	R.TLSDYNIQK.E
508.5600	1522.6582	1522.7740	1	26	K.IQDKEGIPPDQQR.L
894.3400	1786.6654	1786.9200	0	78	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
1017.7000	3050.0782	3049.6257	2	66	-.M(O)QIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK.A

A későbbiekben az ubiquitinálás helyét próbáltam meghatározni a rendelkezésre álló eszközökkel. A módosítás helyének feltérképezése során várható nehézségekkel számolni kellett. Először is, mivel az ubiquitinálás az egyik lehetséges triptikus hasítási helyen (Lys) történik, kimarad a hasítás az adott aminosavnál. Ennek következtében túl nagy peptid is keletkezhet a triptikus emésztés során - ennek különböző hátrányos következménye is lehet a) nem tudjuk a peptidet a gélből extrahálni b) a peptid felragad a fordított fázisú oszlopra c) a tömegspektrométerek érzékenysége általában jelentősen kisebb nagyobb tömegekre. Továbbá feltételezhető, hogy esetleg heterogén protein populációval dolgozunk, azaz az ubiquitin több különböző helyen módosíthatta a vizsgált fehérjét, ami viszont az egyes módosított peptidek mennyiségének csökkenését jelenti, ami szintén megnehezíti a detektálást. A siker érdekében először is megnyújtottuk a frakcionálást: lassú gradienst alkalmaztunk a komponensek tökéletesebb elválasztásának, és így a módosítást tartalmazó peptid detektálásának és fragmentációra kerülésének reményében. Az adatbázis-lekeresések (lásd A mérési adatok kinyerése és feldolgozása részben, 3.3.4.) egyik minta esetében sem határozták meg a módosítás helyét, azaz direkt módon nem sikerült egyik mintából sem kimutatni a módosított peptide(ke)t, ezért további eszközöket (lásd A mérési adatok kinyerése és feldolgozása részben, 3.3.4.) vetettünk be. A fehérje lefedettségének növelése által próbáltuk leszűkíteni a lehetséges Lys aminosavak számát annak reményében, hogy a maradék Lys aminosavak kimutálásával esetleg meg tudjuk majd határozni az ubiquitinálás helyét. Ennek érdekében egyrészt a triptikus elegy LC/MS-MS mérése során hosszú gradiens alkalmaztunk. Másrészt

LC-MALDI analízist is végeztünk, mivel más az ionizáció, mást ionizál és mást, legalábbis nem feltétlenül ugyanazokat a peptideket detektáljuk ugyanabból a mintából.

A következőkben az egyes fehérjék eredményeit tárgyalom.

1. DNA polimeráz ióta

A **DNA polimeráz ióta** lefedettségeinek összefoglalása az összes mintát és mérést figyelembe véve:

```
1 MELADVGAAA SSQGVHDQVL PTPNASSRVI VHVDLDCFYA QVEMISNPFL
51 KDKPLGVQQK YLVVTCNYEA RKLGVKKLMN VRDAKEKCPQ LVLVNGEDLT
101 RYREMSYKVT ELLEEFSPVV ERLGFDENFV DLTEMVEKRL QQLQSDELSA
151 VTVSGHVYNN QSINLLDVLH IRLLVGSQIA AEMREAMYNQ LGLTGCAGVA
201 SNKLLAKLVS GVFKPNQQTV LLPESCQHLI HSLNHIKEIP GIGYKTAKCL
251 EALGINSVRD LQTFSPKILE KELGISVAQR IQKLSFGEDN SPVILSGPPQ
301 SFSEEDSFKK CSSEVEAKNK IEELLASLLN RVCQDGRKPH TVRLIIRRYS
351 SEKHYGRESR QCPIPSHVIQ KLGTGNYDVM TPMVDILMKL FRNMVNVKMP
401 FHLTLLSVCF CNLKALNTAK KGLIDYYLMP SLSTTSRSGK HSFKMKDTHM
451 EDFPKDKETN RDFLPSGRIE STRTRESPLD TTNFSKEKDI NEFPLCSLPE
501 GVDQEVFKQL PVDIQEEILS GKSREKFQGK GSVSCPLHAS RGVLSFFSKK
551 QMQDIPINR DHLSSSKQVS SVSPCEPGTS GFNSSSSSSYM SSQKDYSYYL
601 DNRLKDERIS QGPKEPQGFH FTNSNPAVSA FHSFPNLQSE QLFSRNHTD
651 SHKQTVATDS HEGLTENREP DSVDEKITFP SDIDPQVFYE LPEAVQKELL
701 AEWKRTGSDF HIGHK
```

Az **LC-MS/MS** mérés eredménye által meghatározott szekvencia-szakaszokat (azokat a peptideket, amelyekről van CID spektrum) piros színnel jelöltem. Az **LC-MS** által (csak molekulatömeg alapján) további megmagyarázott szekvencia-szakaszokat kék színnel jelöltem.

2. DNA polimeráz éta

A **DNA polimeráz éta** szekvencia lefedettsége az összes mérést figyelembe véve:

```
1 MATGQDRVVA LVDMDCEFFVQ VEQRQNPHLR NKPCAVVQYK SWKGGGIIAV
51 SYEARAFGVT RSMWADDAKK LCPDLLLAQV RESRGKANLT KYREASVEVM
101 EIMSRFAVIE RASIDEAYVD LTSAVQERLQ KLQQQPISAD LLPSTYIEGL
151 PQGPTTAEET VQKEGMRKQG LFQWLDSLQI DNLTSPDLQL TVGAVIVEEM
201 RAAIERETGF QCSAGISHNK VLAKLACGLN KPNRQTLVSH GSVPQLFSQM
```

251 **PIRKIRSLGG** **KL**GASVIEIL GIEYMGELTQ FTESQLQSHF GEK**NGSWLYA**
 301 **MCR**GIEHDPV KPRQLPKTIG CSKNFPGK**TA** **LAT**REQVQWW LLQLAQELEE
 351 RLTKDR**NDND** **RVATQLVVSI** **RVQGD**KRLSS **L**RCCALTRY **DAH**KMSHDAF
 401 **TVIK**NCNTSG IQTEWSPPLT MLFLCATKFS ASAPSSSTDI TSFLSSDPSS
 451 LPK**VP**TSSE **AKTQSGPAV** **TATK**KATTS**L** **ESFFQ**KAAER QKVKEASLSS
 501 LTAPTQAPMS NSPSKPSLPF QTSQSTGTEP FFK**QKS**LLL**K** **QKQL**NNSSVS
 551 **SPQ**QNPWSNC KALPNSLPTE YPGCVPVCEG VSK**LE**ESSKA **TPA**EMDLA**HN**
 601 **SQ**SMHASSAS **KSV**LEVTQKA **TPN**PSLLAAE **DQVP**CEKCGS LVPVWDMPEH
 651 MDYHFALELQ K**SFL**QPHSSN **PQV**SAVSHQ **GK**RNP**KSPLA** **CTN**K**RPR**EG
 701 **MQT**LESFFKP **LTH**

DNA polimeráz éta szekvencia lefedettsége az ubiquitinált mintát figyelembe véve.

LC-MS (csak molekulatömeg alapján) által további megmagyarázott szekvencia-szakaszok

Az ubiquitin lefedettsége 85%:

3. Rad5 fehérje:

Az adatbázis-lekeresések (lásd mérési adatok kinyerése és feldolgozása részben, 2.3.4.) nem határozták meg az ubiquitinálás helyét, ezért további vizsgálatokat végeztem (2.3.4./ 1-3).

A **Rad5 fehérje** szekvenciájának lefedettsége az összes LC-MS/MS mérést figyelembe véve:

1 **MSHIEQ**EERK **RFF**NDDL**DT**S **ETSL**NFKSEN **K**ESFLFANSH NDDDDDVVVS
 51 VSDTTEGEDD **R**SIVPVRREI **EE**EQNQFIT **ELL**RIIPEMP **KDL**VMELNEK
 101 **FGS**QEGLSL **AL**SHYFDHNS **GTS**ISKIPSS **PN**QLNTLSDT **SN**STLSPSSF
 151 **HPK**RRRIYGF **RN**QTRLEDKV **TW**KRFIGALQ **VT**GMATRPTV **RPL**KYGSQMK
 201 **L**K**R**S**S**EEISA **TK**VYDSRGRK **K**ASMASLVRI **FD**IQYDREIG **RV**SE**DI**AQIL
 251 YPLLSSHEIS FEVTLIFCDN **K**RLSIGDSFI **L**QLDCFLTSL **I**FEER**ND**GES
 301 **LM**KRRRTEGG **NK**REKDN**GN**F **GRT**LTETDEE **LES**RSKRLAL **LKL**FDKLRLK
 351 **PIL**DEQKALE **KH**KIELNSDP **EI**IDLNDDEI **CS**NQVTEVHN **NLR**DTQHEEE
 401 **TM**NLNQLKTF **Y**K**AA**QSSESL **KSL**PETEPSR **DV**FKLELRNY **QK**QGLTWMLR
 451 **RE**QEFKAAS **DGE**ASETGAN **MIN**PLWK**Q**FK **WP**NDMSWAAQ **NL**QQDHVNVE
 501 DGIFYFANLH **S**GEFSLAK**P**I **L**K**TM**IKGGIL **S**DEMGLGKT**V** **AA**YSLVLSCP
 551 **HD**SDVVDK**KL** **FD**IENTAVSD **NLP**STWQDNK **KPY**ASKTTLI **VVP**MSLLTQW
 601 **SNE**FTKANN**S** **PDM**YHEVYYG **GN**VSSLK**TLL** **TK**TKTPPTV**V** **LT**TYGIVQNE
 651 **WTK**HSK**G**RM**T** **DE**DVNISSGL **FS**VNFYRII **DE**GHNIRNRT **TV**TSKAVMAL
 701 **Q**GKCK**W**VLTG **TP**IINRLDDL **YSL**VKFLELD **PWR**QINYWKT **FV**STPFESKN
 751 **YK**QAFDVVNA **IL**EPVLLRRT **KQ**MKDKDGKP **L**VELPPKEV**V** **IK**RLPFSKSQ
 801 **DL**LYKFLLDK **AE**SVKSGIA **RG**DLLKKYST **IL**VHILRLRQ **VC**CHPLIGS
 851 **Q**DENEDLSK **NN**KL**VTE**QTV **EL**DSL**MR**VVS **ER**FDNSFSKE **EL**DAMIQR**LK**

901 VKYPD~~NK~~**SFQ** SLECSICTTE PMDLKALFT ECGHSFCEKC LFEYIEFQNS
 951 KNLGL~~K~~CPNC RNQIDACRLL ALVQ~~T~~NSNSK NLEFKPYSPA SKSS~~K~~ITALL
 1001 KELQLLQDSS AGEQVVIFSQ FSTYLDILE~~K~~ ELTHTFSKDV AKIYKFDGRL
 1051 SLKER**TSVLA** DFAVKDYSRQ ~~K~~ILL~~L~~SLKAG GVGLNLTCAS HAYMMDPWWS
 1101 PSMEDQAIDR LHRIGQ~~T~~NSV KVMRFIIQDS IEEKMLRIQE ~~KK~~RTIGEAMD
 1151 TDEDE~~R~~~~R~~~~R~~ IEEIQMLFE

4. Werner helicase interacting protein 1 (ATPase WRNIP1):

Az adatbázis-lekeresések (lásd A mérési adatok kinyerése és feldolgozása részben) szintén nem határozták meg az ubiquitinálás helyét, ezért további vizsgálatokat végeztem (lásd A mérési adatok kinyerése és feldolgozása részben).

1. **A hosszú LC-MS/MS analízis** (SZE_MGS1H) további feldolgozása A mérési adatok kinyerése és feldolgozása részben, a 75. oldalon leírtaknak megfelelően történt, de így sem sikerült meghatározni az ubiquitinálás helyét.
2. **LC-MALDI analízis** nem magyarázott meg újabb szakaszt a fehérjében az eddigi összes mérést és feldolgozást figyelembe véve.
3. **egy nagy érzékenységű lineáris ioncsapda (Thermo LTQ) készüléken kivitelezett LC-MS/MS analízis** a fehérje 38%-os lefedettségét eredményezte.

A **Werner helicase interacting protein** lefedettsége tehát az összes mérést és feldolgozást figyelembe véve:

1 MEVSGPEDDP FLSQLHQVQC PVCQQMPAA HINSHLDR**CL** LLHPAGHAEP
 51 **AAGSHR**AGER **AKGPSPPGAK** RRR**L**SESSAL **KQ**PATPTAAE **SSEGE**GEEGD
 101 **DGGETESRES** YDAPPTPSGA RLIPDFPVAR SSSPGR**K**GSG **K**RPAAAAAAG
 151 **SASPR**SWDEA EAQEEEEAVG DGDGDGDADA DGEDDPGHWD ADAEEAATAF
 201 GASGGGRPHP **R**ALAAEEIRQ **M**LQGKPLADT **M**RPDTLQDYF **G**QSKAVGQDT
 251 **LLRSLLETNE** IPSLILWGPP GCGKTTLAHI IASNSKKHSI RFVTLSATNA
 301 **KTNDVRDVIK** QAQNE**K**SFF**K** **R**KTILFIDEI **H**RFN**K**SQQDT FLPHVECGTI
 351 TLIGATTENP SFQVNAALLS RCRVIVLEKL PVEAMVTILM RAINSLGIHV
 401 **LDSSRPTDPL** SHSSNSSEP AMFIEDKAVD TLAYLSDGDA RAGLNLQLA
 451 **VLARLSSRM** **FCK****K**SGQSYS PSRVLITEND VKEGLQ~~R~~SHI LYDRAGEEHY
 501 **NCISALHKSM** RGSQDNASLY WLARMLEGGE DPLYVARRLV RFASEDIGLA

551 DPSALTQAVA AYQGCHFIGM PECEVLLAQC VVYFARAPKS IEVYSAYNNV
 601 KACL^{RNHQGP} LPPVPLHLRN APTRLMKDLG YGKGYKNPM YSE^{PVDQEYL}
 651 ^{PEELRGVDFF} KQRR

Azokat a Lys aminosavakat, amelyekről egyáltalán nem sikerült információt nyerni **kék** színnel, amelyeket csak MALDI-TOF mérés során detektáltam és nincs róluk fragmentációs spektrum, azokat **zöld** színnel jelöltem.

A következő (nem azonosított) szakaszok detektálhatóságát megnehezíthette, hogy a triptikus hasítóhelyek elég távol helyezkednek el, és így az emésztés során keletkezett peptidek túl hosszúak:

1-38 MEVSGPEDDP FLSQLHQVQC PVCQQMPAA HINSHLDR
 156-207 SWDEA EAQEEEEAVG DGDGDGDADA DGEDDPGHWD ADAEAATAF GASGGGR
 541-586 FASEDIGLA DPSALTQAVA AYQGCHFIGM PECEVLLAQC VVYFAR

Szennyező fehérjeként **anti-colorectal carcinoma heavy chain** [NCBI#: [425518](#); LOCUS: [AAB28159](#), MW:51,3 kDa] fehérjét azonosítottam mindkét LC-MS/MS analízis esetében. A SpectrumMill adatbázis szerverrel, a Mascot és a Batch-Tag adatbázis-lekeresés során a fehérjéhez rendelhető peptidek a fehérje 23%-os lefedettségét eredményezték. A **rövid analízis** által meghatározott szakaszokat piros színnel, továbbá a **hosszú analízis** során újonnan meghatározott részeket **kék** színnel jelöltem.

1 MYLGLNYVFI VFLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD
 51 AWMDWVRQSP EGGLEWVAEI GNKGNNHATY YAESVKGRFT VSRDDSKSRV
 101 YLQMNSLRVE DTGTYYCTTR FAYWGQGLTV TVSAAK^{TTPP} ^{SVYPLAPGSA}
 151 ^{AQTNSMVTLG} ^{CLVK}GYFPEP VTVTWN^{SGSL} SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS
 201 SVTVPSSTWP SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS
 251 VFIFPPKPKD ^{VL}TITLTPKV TCVVVDISK^D ^{DPEVQFSWFV} ^{DDVEVHTAQT}
 301 ^{QPREEQFNST} FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCR^{VNSAAFP} ^{APIEKT}ISK
 351 KGRPK^{APQVY} ^{TIPPPKEQMA} KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE
 401 NYK^{NTQPIMD} ^{TDGSYFVYSK} LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTTEK
 451 SLSHSPGK

A szennyező fehérje jelenléte nyilván tovább bonyolította az analízist. A mérési adatok kiértékelése és ellenőrzése (mind szoftveres, mind manuális) során számolni kellett annak triptikus peptidjeivel is.

A **Werner helicase interacting protein** ubiquitinálási helyének meghatározása érdekében brómcianidos (CNBr) kémiai hasítással is megpróbálkoztam, mivel az ubiquitin nem tartalmaz metionint, így az utóbbi egyben maradna. Ezt követhette volna a hasítási termékek 2D-gélen való elválasztása, majd a kivágott ubiquitinált polipeptideket tartalmazó gél darabok triptikus emésztése és analízise. A gélben történő CNBr-os emésztés azonban nem volt sikeres, valószínűleg a metioninok oxidációja miatt: a brómcian nem képes metioninszulfoxid mellett hasítani. A fehérjében lévő metionin aminosavak jelentős mértékű oxidációjára a triptikus elegyből kapott eredmények is utaltak. A tripszines emésztés során az emésztményből detektált peptidekben a metionin jelentős mértékben oxidált formában volt jelen. Előfordulhatott volna, hogy ez az oxidáció csak a SDS-PAGE-frakcionált fehérjék további feldolgozása során történt, de a CNBr hasítás sikertelensége arra utal, hogy a redukáló közeg ellenére a gélben lévő fehérje már jelentős mértékben oxidált volt.

3.5. Eredmények tárgyalása és diszkusszió

Mind a négy vizsgált fehérje esetében a poszt-transzlációs módosítást a spektrumokban jelenlévő ubiquitin peptidek igazolták. A módosítás pontos helyének meghatározása még várat magára, azonban minden fehérje esetében jelentős mértékben leszűkítettük a potenciális Lys aminosavak számát, ahol a poszt-transzlációs módosítás megtörténhet. A további kísérletek, amelyek a Lys aminosavak mutációs helyettesítését jelentik, az együttműködő partner csoportjában folynak.

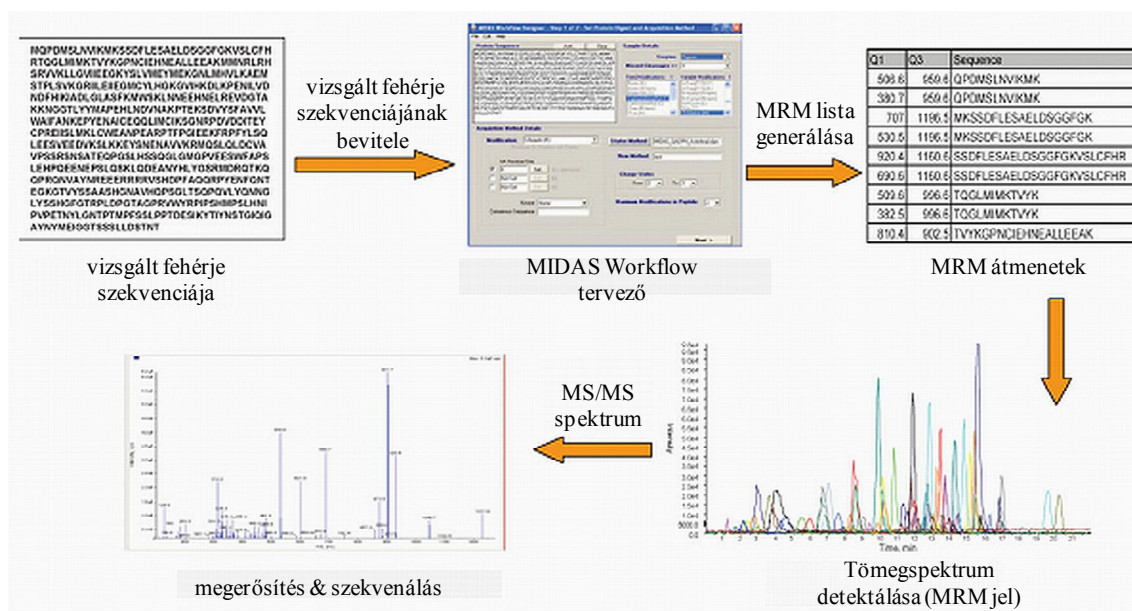
Első megközelítésben nemcsak azokat a lizineket zárhatjuk ki a módosítási helyek közül, amelyeket különböző peptidekben detektáltunk. Feltehetően azok a lizinek sem lehettek ubiquitinálva, amelyeknél a tripszin hasított, azaz a tőlük a fehérje C-terminálisa felé eső triptikus peptidet detektáltuk. Mint említettük ugyanis, tripszin nem hasít acilált Lys után. Ennek figyelembe vételével, a vizsgált fehérjék poszt-transzlációs módosításának lehetséges helyeit a **12. táblázat** mutatja.

fehérje	Lys	lehetséges ubiquitinálási helyek száma	lefedettsége/%	MW/kDa
DNS polimeráz ióta	72, 207, 214, 320,338	5/53 (9%)	63	81.09
DNA polimeráz éta	86, 168, 311, 317, 323, 354, 428, 492, 494, 515	10/48 (21%)	45	78.41
Rad5 fehérje	31, 200, 202, 220, 271, 363, 480, 518, 900, 902, 956, 1053, 1141, 1158	14/96 (15%)	73	134.83
Werner helicase interacting protein 1	137, 316, 320, 335, 459, 463, 627, 633	8/29 (28%)	61	72.83

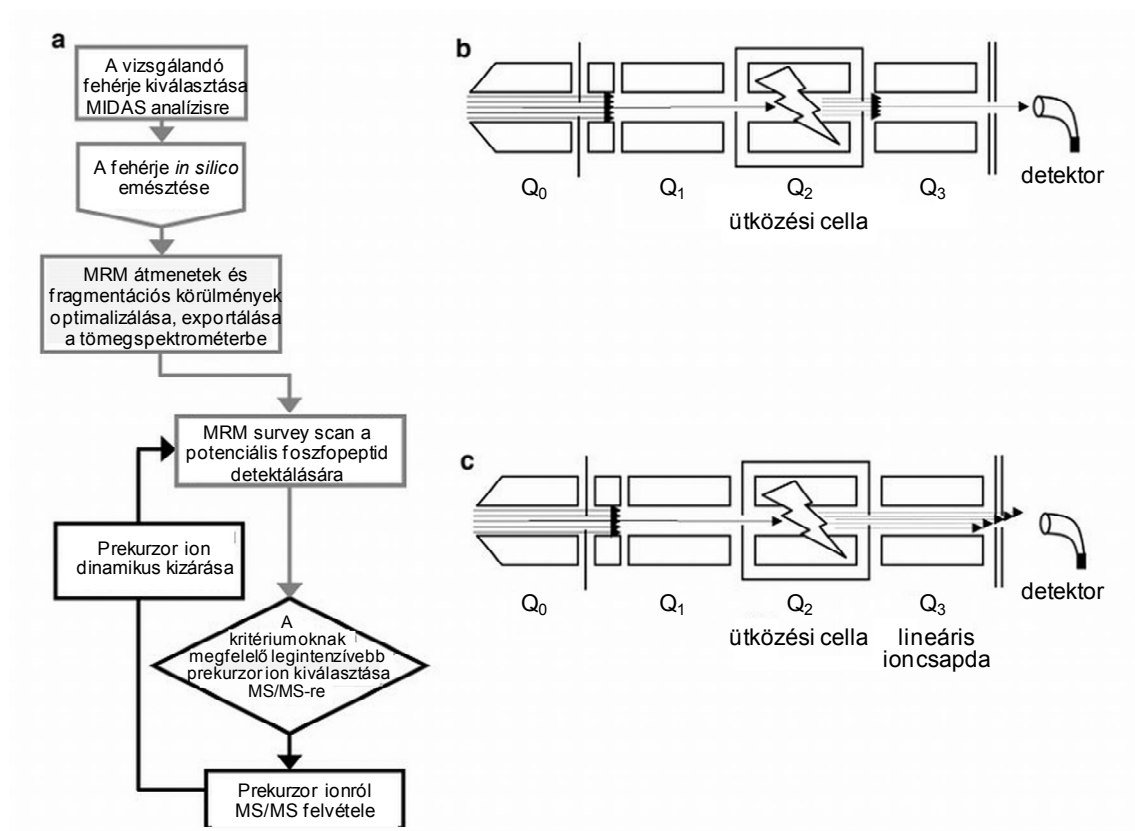
12. táblázat Az egyes fehérjék szekvencia-lefedettségei és potenciális (eddig nem kizárt) ubiquitinálási helyei

Az ubiquitinálás helyét egyelőre nem sikerült kimutatni egyik fehérje esetében sem. A pontos okát egyelőre nem tudjuk, de több logikus magyarázata lehetséges: vagy túl hosszú peptidről van szó, amit nehezebb, vagy nem is tudunk detektálni, vagy eleve kedvezőtlen repülési tulajdonságokkal rendelkezik, illetve az sem kizárható teljes mértékben, hogy a módosítás esetleg több helyen történt. Az utóbbi következtében az adott helyen történt módosítást tartalmazó komponensből/peptidből kis mennyiség jelenléte feltételezhető a

mintában, lehetetlenné téve annak detektálását. A közelmúltban (2007.) megjelent publikáció (161) egy ígéretes megközelítést ír le, amihez az Applied Biosystem által kifejlesztett program (MIDAS™ workflow tervező software) és megfelelő készülék (ebben az esetben 4000 Q Trap®) alkalmazása szükséges. Az ubiquitinált fehérjék analízise a MIDAS™ (MRM-initiated detection and sequencing) munkamenet alapján történt, amely eredetileg foszforilált fehérjék módosítási helyének meghatározására kifejlesztett nagy érzékenységű módszer. A MIDAS workflow MRM adatgyűjtést és egy teljes CID analízist kombinál, kihasználva, hogy az adott szekvenciához tartozó fragmens ionok „megjósolhatók”. Az MRM analízishez a peptideket és a fragmens ionokat “*in silico*” határozzák meg MIDAS workflow Designer programmal bizonyos faktorok figyelembe vétele mellett: fehérje szekvencia, alkalmazott enzim, megengedett kihagyott hasítóhelyek száma, fix és lehetséges módosítások). Az ubiquitinált fehérje vizsgálata során ez azt jelenti, hogy olyan peptidekkel és azok fragmens ionjaival dolgozik a program, amelyek láncközi Lys aminosavat tartalmaznak. Majd ezeknél a peptideknél a program figyelembe veszi a triptikus hasítás során az ubiquitinból visszamaradó GG, illetve kihagyott triptikus hasítás esetén az *LRGG* módosítást, illetve az ezeknek megfelelő +114 és +383 Da különbséget. Az így kapott peptidek tömegét figyelembe véve történik az MRM analízis, ahol természetesen az adott peptidek többszörösen töltött ionjainak és azok fragmens ionjainak a monitorozására kerül sor (24. és 25. ábra).



24. ábra Az ubiquitinált-peptideket bizonyító és megerősítő célzott LS-MS/MS analíziseket megszervező MIDAS™ munkafolyamat folyamatábrája (161)



25. ábra A MIDAS technika magyarázó folyamatábrája. **a**, A MIDAS protokoll folyamatábrája. Először az analízis szempontjából érdekes ion meghatározása, majd az MRM Builder program által a prekursor-fragmens ion átmeneti lista generálása a megfelelő ütközési energiákkal a poszt-transzlációs módosítás felderítéséhez. A tömegspektrométer ezeket az adatokat felhasználva végzi az egymást követő szkennelési ciklusokat és választja ki a megfelelő iont az MS/MS analízisre. Majd meghatározott időre (pl., 2 perc) ezeknek az ionoknak a kizárása történik. **b**, A 4000 QTRAP készülék sematikus ábrája, ahol a Q₃ kvadrupól tömegszűrőként konfigurálták. Az adatgyűjtés közben a prekursor ionokat egymást követően és szelektíven a Q₁-en továbbítja át. Az ütközési cellában (Q₂) történik az ion fragmentációja (CID), a megfelelő MRM fragmens („product”) ion szelektíven továbbítódik Q₃-on keresztül a detektorba. **c**, A 4000 QTRAP készülék sematikus ábrája, ahol a Q₃-at lineáris ioncsapdaként konfigurálták. A prekursor ion CID fragmentációja alatt keletkező összes fragmens ion az ioncsapdába (Q₃) jut. (162)

Ehhez hasonló típusú megközelítést mi is alkalmaztunk, de egyrészt manuálisan és nem a teljes fehérjére. Csak a fehérje azon szakaszaira határoztuk meg a Lys-t tartalmazó peptideket, amiről nem készült fragmentációs spektrum és a kapott peptidek GG, illetve LRGG módosított peptidjeik többszörösen töltött ionjaiknak megfelelő tömegeket jelöltük ki fragmentációra. Azaz a mi esetünkben csak MS/MS spektrumok készültek, nem történt MRM analízis. A rendelkezésünkre álló LC/MS készülék nem teszi lehetővé az MRM analízist, és a preferenciálisan kezelendő prekursor ionok száma (inclusion list) is csak korlátozott számú

komponenst tartalmazhat. Tehát olyan készülékre lenne szükségünk az ubiquitinálási hely “direkt” meghatározásához, ami lehetővé tenné, hogy az analízis során csak a potenciális ubiquitinálást tartalmazó tömegeket monitorozzuk, és csak ezekről készüljön CID spektrum.

4. Összefoglalás

A Proteomikai Kutatócsoportban töltött idő alatt számottevő gyakorlatra tettem szert fehérjék tömegspektrometriás analízisében. A módszerrel való megismerkedés során különféleképpen elválasztott (1D, 2D gélelektroforézis) fehérjék vizsgálata során elsajátítottam az alapvető ismereteket (mintaelőkészítés, adatgyűjtés, adatbázis-lekereső módszerek, programok). A fehérjék azonosítása és főleg vizsgálata során az egyik nehézséget egy megfelelő készülék hiánya okozhatja, azaz ha a rendelkezésre álló műszer csak molekulatömeg meghatározásra alkalmas, illetve ha körülményesebb megfelelő számú és minőségű MS/MS spektrum felvétele. További nehezítő tényező lehet, ha az adott fajra nézve az adatbázis hiányos vagy nem is létezik. Ebben az esetben még fontosabb nagyobb szekvencia-információt (egy analízis során számos MS/MS-t) szolgáltató, megbízható készülék. Munkám során több alkalommal ütköztem abba a problémába, amikor a vizsgált mintának megfelelő fajra nézve nem volt kielégítő a nyilvánosan hozzáférhető adatbázis (pl. *Triticum aestivum*/búza). A legnagyobb nehézséget azonban a *Streptomyces griseus* fehérjék jelentették. Az adott faj esetében még egyéb trükkök bevetése (pl., *de novo* szekvenálás, Expressed Sequence Tag, azaz EST adatbázis lekeresés) sem vezetett eredményre, ugyanakkor a génállományt sem szekvenálták meg teljes mértékben, legalábbis az interneten nem tették elérhetővé az eredményeket. Annak ellenére, hogy a vizsgált mintákból felvett MALDI-TOF spektrumok jelentős része kiváló minőségű volt, közel 50 mintából csak kilenc fehérjét tudtunk azonosítani (1). Az utóbbi évben azonban elérhetővé vált egy *Streptomyces griseus* fehérjeadatbázis (<http://streptomyces.nih.go.jp/gview/>), aminek segítségével számos további fehérjét sikerült meghatározni (**13. táblázat**) a régi mérések eredményeit felhasználva (közlemény előkészületben).

A fehérjeminták vizsgálata során a sima azonosításon túl (lásd fentiekben) találkoztam különböző kovalens módosításokkal, amelyek akár poszt-transzlációs módosításnak is tekinthetőek. Egyes felfogás szerint ugyanis minden fehérjéken megfigyel kovalens módosítás PTM, csak van, ami *in vivo*, mások meg *in vitro* következnek be. Ezek közül egyesek biológiai (acetileződés, oxidáció), mások pedig kémiai folyamat (oxidáció, commassie festés során tapasztalt metilészterképződés) (1) eredményeképpen jöttek létre. Az előtanulmányok felkészítettek arra a két területre, amellyel a későbbiekben foglalkoztam: a MALDI-TOF tömegspektrometria kvantitatív jellegének tanulmányozására a tömegspektrumokban fellépő

szuppressziós jelenség mellett és egy kovalens módosításnak, az ubiquitinálásnak a vizsgálatára bizonyos fehérjék esetében.

	fehérje	ID
1.	putative cellulose-binding protein 2005-10-04	SGR5773
2.	putative secreted hydrolase 2005-01-13	SGR3364
3.	hypothetical protein 2005-01-14	SGR3600
4.	hypothetical protein 2005-01-07	SGR1538
5.	conserved hypothetical protein 2006-09-02	SGR5581
6.	melC2-2 putative putative tyrosinase 2006-08-19	SGR2447
7.	putative secreted peptidyl-prolyl cis-trans isomerase protein 2005-01-21	SGR5864
8.	conserved hypothetical protein 2006-08-23	SGR2963
9.	putative subtilisin-like serine protease 2005-05-14	SGR918
10.	putative ATP/GTP-binding protein 2005-01-07	SGR1460
11.	hypothetical protein 2005-01-17	SGR4182
12.	putative superoxide dismutase 2004-12-15	SGR2245
13.	conserved hypothetical protein 2006-09-04	SGR5704
14.	putative arginine/ornithine binding protein 2004-12-15	SGR2237
15.	putative ABC transporter solute-binding protein 2005-01-07	SGR1498
16.	putative glutamate ABC transporter substrate-binding protein 2006-08-21	SGR1737
17.	putative ABC transporter maltose-binding protein 2007-05-29	SGR5275
18.	putative thiolase 2005-01-17 proteint	SGR4450
19.	putative aminotransferase 2005-06-18	SGR3109
20.	putative amino acid ABC transporter substrate-binding protein 2006-08-28	SGR4713

13. táblázat A *Streptomyces griseus* mintákból azonosított újabb fehérjék a *Streptomyces griseus* fehérjeadatbázis hozzáférést követően.

MALDI-TOF tömegspektrometria kvantitatív jellegének a tanulmányozása

Az MS alapon történő relatív kvantifikáció alapja a vizsgált molekula és a referencia molekula koncentráció arány meghatározása azok relatív intenzitásából kalibrációs egyenes felhasználásával. Annak a hipotézisnek az ellenőrzésére, hogy a vizsgált molekula és a referencia molekula intenzitása arányosan változik-e a minta ismételt mérése során (mindkét peptid koncentrációját állandó értéken tartva), a két peptid intenzitását, illetve relatív intenzitását egymás függvényében ábrázoltam. Az eredmények a vizsgált peptidek gyenge korrelációját mutatták, ami azt jelenti, hogy az egyes mérések során fellépő hatások (pl., az eltérő kristályosodásból) a két peptid intenzitásának változását eltérő mértékben befolyásolták.

A gyakorlatban a kvantifikáció során kalibrációs egyenest alkalmaznak, amely az adott két komponens (vizsgált molekula és referencia molekula) koncentráció arány és relatív intenzitása közötti összefüggést reprezentálja. A munkám során a koncentráció arány és relatív intenzitás közötti regresszió minden esetben rendkívül szignifikáns volt ($p < 0.001$). A regresszió egyenestől való eltérése (divergencia) nem mutatott szignifikáns értéket ($p > 0.05$), ami azt jelenti, hogy a relatív intenzitás és a koncentráció arány közötti regresszió lineáris. A regressziós egyenesek szignifikáns eltérést mutattak a nullától ($p < 0.001$). Az R^2 értékek széles tartományon belül mozogtak (0.2241 - 0.868). A számolt 95 %-os konfidencia intervallum elég széles volt a kis R^2 értékek mellett, ami az adatok nagymértékű variációját és alacsony reprodukálhatóságát jelzi a szignifikáns regresszió ellenére.

Bemutattam, hogy adott koncentráció arányhoz tartozó relatív intenzitások középértékének ábrázolása az R^2 érték jelentős mértékű növekedését eredményezi (0.845-0.9885). Az átlagolás tehát az adatok szórásának elrejtéséhez és a precizitás téves felbecsüléséhez vezet.

A vizsgált peptid stabil izotóppal jelölt analógjának kvantitatív mérésekben való alkalmazása során a determinációs koefficiens (R^2) és a 95%-os konfidencia tartomány csak kisebb mértékű javulást mutatott a kvantitatív mérések vizsgálatához nem stabil izotópszármazékot alkalmazó mérések eredményeihez képest. Amennyiben azonban a koncentráció arányt csak a 0.5-5.0 intervallumban vettük figyelembe, drasztikusan beszűkült a konfidencia intervallum és jelentős mértékben megnövekedett az R^2 értéke. A kapott koncentráció arány értékek közelebb estek az aktuális/valós értékekhez, mint azoknál a meghatározásoknál, amikor a vizsgálatokhoz nem az adott peptid stabil izotóppal jelölt származékát alkalmaztuk referenciamolekulaként. Következésképpen, a meghatározandó minta és a standard mennyiségeinek és jelintenzitásainak aránya csak bizonyos szűk tartományon belül mutat lineáris regressziót és erős korrelációt, azaz csak ezen a keskeny tartományon belül adhat kvantitatív mérések során megbízható eredményt.

A kalibrációs egyenes felhasználásával gyámolt koncentráció arányok megbízhatóságának kifejezésére bevezettem egy új paramétert, az inverz konfidencia intervallumot. Az inverz konfidencia intervallum jelentős mértékben leszűkült a vizsgált peptid stabil izotóppal jelölt analógjának referencia peptidként való alkalmazása során, ami a kapott eredmények reprodukálhatóságának a javulását jelenti.

A minta összetételének változása minden esetben a kalibrációs egyenes meredekségének szignifikáns mértékű változását eredményezte, ami a külső kalibrációs egyenes koncentráció arányok számításához való alkalmazásának a hibáját jelzi. Következésképp magának a mintának a használatát javaslom a kalibráció elvégzésére, a vizsgált peptid két stabil izotóppal

jelölt analógjának a felhasználásával. Ez utóbbit az endogén eredetű meghatározandó minta figyelmen kívül hagyásából eredő pontatlanság kiküszöbölése érdekében. Tehát, a kalibráció során előállított mintasorozatban a változó koncentrációjú komponensnek és az állandó mennyiségben jelenlévő belső standard-nek a meghatározandó molekula két eltérő stabil izotóppal jelölt analógjának kellene lennie.

A fenti eredmények alapján a MALDI-TOF MS mérésen alapuló kvantitatív meghatározások során a kapott eredmények statisztikai analízise ajánlott. Továbbá javaslok a becsült koncentráció arányok relatív intenzitásokból való meghatározásához az “inverz” konfidencia határok feltüntetését, ami egyben a mérés precizitását jelzi.

A kvantitatív mérések pontosságának és precizitásának javítására a következő lehetőségeket javaslok: a kalibrációs görbe pontjai számának növelése ($n_{\min} = 8-10$ minden koncentráció-aránynál), több lézerlövés elvégzése (min. 1000/spot), illetve azon mérések számának (N') a növelése, amelyek az ismeretlen koncentráció-arány (X') meghatározására szolgálnak. Továbbá a kalibrációs egyenest minden mérési pont felhasználásával kell illeszteni, nem csupán az átlagértékekre, így valós képet kaphatunk annak megbízhatóságáról, amit az R^2 érték és a konfidencia határok jeleznek. Mivel a kalibrációs egyenes csak nagyon szűk tartományon belül (5-szörös koncentráció arányon belül) lineáris, ezért minimum kétlépéses kalibráció javasolt a kvantitatív meghatározásokra: az elsőt a nagyságrend becslésére, a másodikat a pontos meghatározásra.

Bizonyos fehérjék ubiquitinálásának vizsgálata

A munkám során vizsgált ubiquitinált modell rendszereinkben, a human: DNS polimeráz α , DNS polimeráz β , Werner helicase interacting protein (ATPase WRNIP1) és *Saccharomyces cerevisiae* Rad5 protein esetében az ubiquitinálás tényét sikerült igazolni, ugyanakkor a módosítás helyének pontos meghatározása még várat magára.

A nehézségek egy részét az adta, hogy az ubiquitinálást tartalmazó peptid nem mutat speciális fragmentációt, illetve az ubiquitinálási hely meghatározása során nem áll rendelkezésre speciális dúsítás. Ennek a problémának a kompenzálására a vizsgált fehérjék on-line vagy off-line frakcionálásával a rendelkezésre álló alternatív ionizációs technikák (MALDI, ESI) használatával igyekeztünk minden komponenst detektálni, és a tripszines emésztés után a Lys-oldalláncon visszamaradó Gly-Gly, illetve kihagyott triptikus hasítóhely esetében Leu-Arg-Gly-Gly módosítást azonosítani. A vizsgálatok során a laboratóriumban rendelkezésre álló

készülékeket felhasználva (MALDI-TOF MS, Agilent XCT Plus 3D ioncsapda, off-line LC-MALDI) és egyéb rendelkezésre álló lehetőségekkel (Thermo LTQ készülék, München) is élve igyekeztük a feladatot teljesíteni. A másik problémát az okozhatta, hogy a módosítást tartalmazó peptid detektálhatósága nem megfelelő, aminek több lehetséges magyarázata lehet, mint pl., túl hosszú a peptid, nem megfelelő a peptid bázicitása, hidrofóbicitása, vagy túl kis mennyiségben van jelen. A frakcionálások során lassú gradienst alkalmaztunk, hogy az esetleges módosítást tartalmazó peptid detektálásának és fragmentációra kerülésének a lehetőségét és valószínűségét ezzel is növeljük az analízis során. A tömegspektrometriás mérések eredményei minden egyes fehérje esetében a lehetséges ubiquitinálási helyek számának jelentős mértékű leszűkítéséhez vezettek a fehérjék lefedettségének növelésével. Jelenleg az együttműködő Haracska Lajos csoportjában folynak az erre irányuló mutációs kísérletek a tömegspektrometriás analízisek eredményeit figyelembe véve. Illetve reménykedünk abban, hogy a fejezet végén vázolt célzott tömegspektrometriás kísérletet megkísérelhetjük majd a megfelelő készüléken egy együttműködés formájában.

5. Summary

In the Proteomics Research Group, I have acquired considerable practice in protein analysis by mass spectrometry. I came to know the basic knowledge (sample preparation protocols, spectrum processing, data acquisition, database search methods and softwares etc.) during analysis of proteins separated by different methods (1D, 2D gel electrophoresis). In the course of my work, I also met difficulties and picked up some practice to solve them and the shortcomings of mass spectrometry. One possible difficulty of protein identification and analysis is when suitable instrument is not available. Specifically, when only mass determination is possible, if the generation of sufficient number and quality MS/MS spectra which have sequence information is difficult, or when the identification of more than protein is the challenge. Another possible difficulty is incomplete or missing sequence-database concerning the species of interest. Reliable instruments providing fragmentation spectra (MS/MS) are even more important in these cases. I faced this problem several times in the course of my work, when the publicly available database was not satisfactory relating to the species of interest (for instance, *Triticum aestivum*). Identification of *Streptomyces griseus* proteins meant the largest challenge. In most cases, none of my attempts led to protein identification in the samples derived from this species [for instance, *de novo* sequencing; EST (Expressed Sequence Tag) database search]. The genes were either not sequenced at the time the samples were analysed or the data were not available to the public. Therefore, despite the excellent quality MALDI-TOF MS and MS/MS spectra, only 9 proteins were identified from 50 samples (1). Fortunately, the *Streptomyces griseus* protein database was lately opened up on-line, and this way we succeeded in the identification of additional proteins using the data of the primary measurements (**Table 13.**). These results have not been published yet.

In the course of my protein identification-work (see above) I met various covalent modifications, which are regarded as post-translational modifications. According to a certain conception, every modification of proteins is regarded as post-translational modification. Some of them happen *in vivo*, but the others under *in vitro* circumstances. Some of them are formed by biological processes (acetylation, oxidation) and others by chemical processes (oxidation, observed methyl ester formation applying coomassie stain) (1). The initial work on protein-identification prepared me for my two further topics: investigation of the quantitative nature of MALDI-TOF mass spectrometry and analysis of a covalent modification, the ubiquitination of given proteins.

	protein	ID
1.	putative cellulose-binding protein 2005-10-04	SGR5773
2.	putative secreted hydrolase 2005-01-13	SGR3364
3.	hypothetical protein 2005-01-14	SGR3600
4.	hypothetical protein 2005-01-07	SGR1538
5.	conserved hypothetical protein 2006-09-02	SGR5581
6.	melC2-2 putative putative tyrosinase 2006-08-19	SGR2447
7.	putative secreted peptidyl-prolyl cis-trans isomerase protein 2005-01-21	SGR5864
8.	conserved hypothetical protein 2006-08-23	SGR2963
9.	putative subtilisin-like serine protease 2005-05-14	SGR918
10.	putative ATP/GTP-binding protein 2005-01-07	SGR1460
11.	hypothetical protein 2005-01-17	SGR4182
12.	putative superoxide dismutase 2004-12-15	SGR2245
13.	conserved hypothetical protein 2006-09-04	SGR5704
14.	putative arginine/ornithine binding protein 2004-12-15	SGR2237
15.	putative ABC transporter solute-binding protein 2005-01-07	SGR1498
16.	putative glutamate ABC transporter substrate-binding protein 2006-08-21	SGR1737
17.	putative ABC transporter maltose-binding protein 2007-05-29	SGR5275
18.	putative thiolase 2005-01-17 proteint	SGR4450
19.	putative aminotransferase 2005-06-18	SGR3109
20.	putative amino acid ABC transporter substrate-binding protein 2006-08-28	SGR4713

Table 13. The additional identified proteins from *Streptomyces griseus* samples since the *Streptomyces griseus* protein database has become available.

Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS

Relative quantitation using MS means calculating the concentration of a certain component based on the relative intensity of its signal and the relative intensity of the signal of a reference molecule, having a known concentration. To test the assumption that the signal of the analyte is proportional to that of the standard, I plotted the relative signal intensities of two peptides against each other, with both peptide concentrations kept constant. I observed poor correlation, indicating that the factors influencing their relative intensities act on them to a different extent.

In practice, quantitation is carried out by plotting calibration lines illustrating the relation between the intensity ratio and concentration ratio of two components. In my study, the regression between the concentration ratio and the relative intensity ratio of two peptides was highly significant ($p < 0.001$) and linear, with the slope being significantly different from zero ($p < 0.001$). The divergence from linearity was not significant ($p > 0.05$), meaning the regression was linear. The R^2 values varied in wide range (0.2241-0.868). The observed 95 % confidence

limits were relatively wide, along with a low R^2 value, indicating the large variation and poor reproducibility of the data, *despite* the significance of the regression.

I demonstrated that much higher R^2 values (0.845-0.9885) can be obtained by generating calibration lines considering only the mean values of several relative intensity ratio measurements. However, this approach, used by many authors, leads to an erroneous overestimation of precision by ignoring the large variation of relative intensities.

Using a stable isotope-labeled derivative of the analyte the coefficient of determination (R^2) and the 95% confidence range displayed only a slight improvement compared to the non-isotope measurements. However, considering only the relative concentration range of 0.5 to 5 dramatically narrowed the confidence belt and increased the R^2 value. The calculated concentration ratios fell closer to the actual values than they did when unrelated internal standards were used as a reference.

I introduced a new parameter, the inverse confidence limit to determine the reliability of the calculated concentration ratios using calibration lines. The 95% inverse confidence ranges were significantly narrower if stable isotopes were used as reference molecule, indicating the increased reproducibility of the results calculated this way. (21)

In all cases, the change of the molecular milieu resulted in a highly significant alteration of the slopes of the calibration lines, indicating the error of using an external calibration for concentration calculations. Accordingly, quantitation should be performed ideally within the sample with two isotopically labeled versions of the molecule of interest. The two versions are needed to avoid the inaccuracy caused by ignoring the endogenous analyte content of the sample.

Based on the above observations thorough statistical analysis should be performed whenever MALDI-TOF-MS data are used for quantitation. I recommend the calculation and publishing of the 95 % inverse confidence limits of the estimated concentration ratios. The calibration line should be generated using every data point, not just the averages of measurements made at equal concentration ratios. This way, we get real information on the reliability of the calibration line, indicated by the R^2 value and the confidence limits.

I presented possible ways to further improve the accuracy and precision of quantitative measurements. These are the following: increasing the number of data points used for the calibration line ($n_{\min} = 8-10$ in every concentration ratio: k); increasing the total number of measurements ($N=n*k$) used for calibration; averaging of many laser shots over a large sample area (min. 1000/spot); and increasing the number of measurements (N') corresponding to the unknown concentration ratio (X'). Since the linearity of the calibration line can only be

maintained in a 5 fold range of concentration-ratios, preliminary measurements (minimum of two) are needed to approximate the concentration of the compounds investigated, prior to generation of the calibration line used for exact quantitation.

Analyzing the ubiquitination of certain proteins

In this project, my task was to verify the ubiquitination of various proteins, and to identify the site(s) of this modification. The presence of ubiquitination was confirmed on every protein of interest: on DNA polymerase α , DNA polymerase β and Werner helicase interacting protein (ATPase WRNIP1) from *human* and on *Rad5* from *Saccharomyces cerevisiae*. However, the determination of the ubiquitination site was unsuccessful in every case.

There were several difficulties hindering the identification of the ubiquitination site. First, the peptide containing ubiquitination did not show specific fragmentation and there were no procedures available for specific enrichment of the modified subpopulation. In order to detect as many of the components as possible, on-line and/or off-line fractionation of the peptides and all accessible alternative ionization techniques (MALDI, ESI) were applied. Different mass spectrometers (Bruker Reflex MALDI-TOF MS, Agilent XCT Plus 3D ion trap, off-line LC-MALDI, Thermo LTQ Instruments, München) were used to fulfill the task. Using all possible ways, we aimed at detecting all components from the samples to determine the *GG* modification leftover on the Lys residue after trypsin digestion or the *LRGG* modification left over on the Lys residue where trypsin digestion was incomplete. The other problem could be the poor detectability of the modification-containing peptide, which has several reasonable explanations: too long peptide, not sufficient basicity or hydrophobicity of the peptide or low amount of the molecules of interest. Slow gradient was used in fractionation to increase the chances of the detection and fragmentation of the peptide bearing the modification. So far, the mass spectrometry analyses of the samples carried out led to the considerable reduction in the number of possible ubiquitination sites. Further mutation experiments are in progress in our collaborator's laboratory systematically eliminating all Lys residues from the protein considered as possible sites of modification. Finally, we hope that we can attempt identification of ubiquitination sites using more advanced mass spectrometers in the near future.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Medzihradszky F. Katalinnak Ph.D. munkám vezetését, hasznos tanácsait és építő kritikáit, amelyekkel egyben segítette fejlődésemet a tömegspektrometria területén. Dr. Fehér Tamásnak a statisztikai kiértékelésekben nyújtott segítségét, Dr. Hunyadi-Gulyás Évának, Klement Évának és Dr. Darula Zsuzsannának munkám kezdetén a betanítást, a későbbiekben pedig hasznos tanácsaikat, és segítségüket. Továbbá szeretnék köszönetet mondani Dr. Vizler Csabának.

Szeretnék köszönetet mondani együttműködő partnereinknek: Dr. Ovádi Juditnak, Oláh Juditnak, Dr. Biró Sándornak, Dr. Birkó Zsuzsannának, Dr. Unk Ildikónak, Dr. Haracska Lajosnak és Burkovics Péternek.

Köszönöm a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak az anyagi támogatásért munkám befejezéséhez. Köszönöm az SzBK főigazgatójának, Dr. Dudits Dénesnek és a Főigazgatói Csoport adminisztratív vezetőjének, Dr. Páy Anikónak, hogy támogatást nyújtottak ahhoz, hogy kutatómunkámat az SzBK-ban végezhessem.

Köszönöm a Bio-Science Kft.-nek és azon belül Süle Andreának, hogy a munkámhoz szükséges Heavy PeptideTM AQUA Demo Kit-et biztosította.

Végül szeretnék köszönetet mondani Dr. Kovács Lajosnak és Dr. Paragi Gábornak, akik Ph.D. munkám kezdetén segítették szakmai fejlődésemet.

Referenciák

1. Birko, Z., Bialek, S., Buzas, K., Szajli, E., Traag, B. A., Medzihradszky, K. F., Rigali, S., Vijgenboom, E., Penyige, A., Kele, Z., van Wezel, G. P., and Biro, S., (2007) The secreted signaling protein factor C triggers the A-factor response regulon in *Streptomyces griseus*: overlapping signaling routes *Mol. Cell Proteomics* 6, 1248-1256.
2. Stu Borman, H. R. A. S., (2003) A Mass Spec Timeline *Chemistry Chronicles* 47-49.
3. Karas, M. and Hillenkamp, F., (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons *Anal. Chem.* 60, 2299-2301.
4. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M., (1989) Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules *Science* 246, 64-71.
5. Edmond de Hoffmann, V. S., (2002) Mass Spectrometry: Principles and Applications second edition,
6. Coles, J. and Guilhaus, M., (1993) Orthogonal Acceleration - A New Direction for Time-Of-Flight Mass-Spectrometry - Fast, Sensitive Mass Analysis for Continuous Ion Sources *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 12, 203-213.
7. Guilhaus, M., Selby, D., and Mlynski, V., (2000) Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry *Mass Spectrometry Reviews* 19, 65-107.
8. Michael Kinter, Nicholas E. Sherman, (2000) Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry
9. Guerrero, I. C. and Kleiner, O., (2005) Application of mass spectrometry in proteomics *Biosci. Rep.* 25, 71-93.
10. Aebersold, R. and Mann, M., (2003) Mass spectrometry-based proteomics *Nature* 422, 198-207.
11. Wilm, M. and Mann, M., (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source *Anal. Chem.* 68, 1-8.
12. Fournier, I., Brunot, A., Tabet, J. C., and Bolbach, G., (2002) Delayed extraction experiments using a repulsive potential before ion extraction: Evidence of clusters as ion precursors in UV-MALDI. Part I: Dynamical effects with the matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid *International Journal of Mass Spectrometry* 213, 203-215.
13. Benito Canas, Lopez-Ferrer, D., Ramos-Fernandez, A., and Camafeita, E. a. C. E., (2007) Mass spectrometry technologies for proteomics *Briefings in functional genomics and proteomics* 4., 295-320.

14. Marc Wilkins, (1995) 2D Electrophoresis: From Protein Maps to Genomes. Proceedings of the International Meeting. Siena, Italy, September 5-7, 1994. *Electrophoresis* 7, 1077-322.
15. Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L., and Humphery-Smith, I., (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* *Electrophoresis* 16, 1090-1094.
16. Patterson, S. D. and Aebersold, R. H., (2003) Proteomics: the first decade and beyond *Nat. Genet.* 33 Suppl, 311-323.
17. O'Farrell, P. H., (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
18. Klose, J., (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals *Humangenetik.* 26, 231-243.
19. Scheele, G. A., (1975) Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins *J. Biol. Chem.* 250, 5375-5385.
20. Henzel, W. J., Proceedings of the Third Symposium of the Protein Society
21. Eng, J. K., McCormack, A. L., and Yates, J. R., (1994) An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in A Protein Database *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 5, 976-989.
22. Stults, J. T. and Arnott, D., (2005) Proteomics *Methods Enzymol.* 402, 245-289.
23. Olah, J., Tokesi, N., Vincze, O., Horvath, I., Lehotzky, A., Erdei, A., Szajli, E., Medzihradszky, K. F., Orosz, F., Kovacs, G. G., and Ovadi, J., (2006) Interaction of TPPP/p25 protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and their co-localization in Lewy bodies *FEBS Lett.* 580, 5807-5814.
24. Szajli, E., Feher, T., and Medzihradszky, K. F., (2008) Investigating the Quantitative Nature of MALDI-TOF MS *Molecular & Cellular Proteomics* 7, 2410-2418.
25. Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T., and Watson, J. T., (1987) Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine *Anal. Chem.* 59, 2621-2625.
26. Haebel, S., Albrecht, T., Sparbier, K., Walden, P., Korner, R., and Steup, M., (1998) Electrophoresis-related protein modification: alkylation of carboxy residues revealed by mass spectrometry *Electrophoresis* 19, 679-686.
27. Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A., and Pappin, D. J., (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents *Mol. Cell Proteomics.* 3, 1154-1169.

28. Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., and Aebersold, R., (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags *Nat. Biotechnol.* 17, 994-999.
29. Shadforth, I. P., Dunkley, T. P., Lilley, K. S., and Bessant, C., (2005) i-Tracker: for quantitative proteomics using iTRAQ *BMC. Genomics* 6, 145-
30. Unwin, R. D., Pierce, A., Watson, R. B., Sternberg, D. W., and Whetton, A. D., (2005) Quantitative proteomic analysis using isobaric protein tags enables rapid comparison of changes in transcript and protein levels in transformed cells *Mol. Cell Proteomics.* 4, 924-935.
31. Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M., (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics *Mol. Cell Proteomics.* 1, 376-386.
32. Zang, L., Palmer, T. D., Hancock, W. S., Sgroi, D. C., and Karger, B. L., (2004) Proteomic analysis of ductal carcinoma of the breast using laser capture microdissection, LC-MS, and 16O/18O isotopic labeling *J. Proteome. Res.* 3, 604-612.
33. Stewart, I. I., Thomson, T., and Figeys, D., (2001) 18O labeling: a tool for proteomics *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 2456-2465.
34. Mirgorodskaya, O. A., Kozmin, Y. P., Titov, M. I., Korner, R., Sonksen, C. P., and Roepstorff, P., (2000) Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1226-1232.
35. Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., and Gygi, S. P., (2003) Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 6940-6945.
36. Witze, E. S., Old, W. M., Resing, K. A., and Ahn, N. G., (2007) Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry *Nat. Methods* 4, 798-806.
37. Christopher Walsh, (2006) Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory 1-490.
38. Karas, M., Gluckmann, M., and Schafer, J., (2000) Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors *J. Mass Spectrom.* 35, 1-12.
39. Tabb, D. L., McDonald, W. H., and Yates, J. R., III, (2002) DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics *J. Proteome. Res.* 1, 21-26.
40. Burlingame, A. L., Boyd, R. K., and Gaskell, S. J., (1998) Mass spectrometry *Anal. Chem.* 70, 647R-716R.

41. Hensel, R. R., King, R. C., and Owens, K. G., (1997) Electrospray sample preparation for improved quantitation in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 1785-1793.
42. Siuzdak, G. and Lewis, J. K., (1998) Applications of mass spectrometry in combinatorial chemistry *Biotechnol. Bioeng.* 61, 127-134.
43. Desiderio, D. M., Wirth, U., Lovelace, J. L., Fridland, G., Umstot, E. S., Nguyen, T. M., Schiller, P. W., Szeto, H. S., and Clapp, J. F., (2000) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric quantification of the mu opioid receptor agonist DAMGO in ovine plasma *J. Mass Spectrom.* 35, 725-733.
44. Yan, W., Gardella, J. A., Jr., and Wood, T. D., (2002) Quantitative analysis of technical polymer mixtures by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 914-920.
45. Zabet-Moghaddam, M., Heinzle, E., and Tholey, A., (2004) Qualitative and quantitative analysis of low molecular weight compounds by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 141-148.
46. Tholey, A., Zabet-Moghaddam, M., and Heinzle, E., (2006) Quantification of peptides for the monitoring of protease-catalyzed reactions by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrixes *Anal. Chem.* 78, 291-297.
47. Chen, H., He, M., Pei, J., and He, H., (2003) Quantitative analysis of synthetic polymers using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Anal. Chem.* 75, 6531-6535.
48. Muddiman, D. C., Gusev, A. I., Proctor, A., Hercules, D. M., Venkataramanan, R., and Diven, W., (1994) Quantitative measurement of cyclosporin A in blood by time-of-flight mass spectrometry *Anal. Chem.* 66, 2362-2368.
49. Bucknall, M., Fung, K. Y., and Duncan, M. W., (2002) Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 1015-1027.
50. Trimpin, S., Keune, S., Rader, H. J., and Mullen, K., (2006) Solvent-free MALDI-MS: developmental improvements in the reliability and the potential of MALDI in the analysis of synthetic polymers and giant organic molecules *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17, 661-671.
51. Fujiwaki, T., Tasaka, M., Takahashi, N., Kobayashi, H., Murakami, Y., Shimada, T., and Yamaguchi, S., (2006) Quantitative evaluation of sphingolipids using delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with sphingosylphosphorylcholine as an internal standard. Practical application to cardiac valves from a patient with Fabry disease *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 832, 97-102.

52. Duncan, M. W., Matanovic, G., and Cerpa-Poljak, A., (1993) Quantitative analysis of low molecular weight compounds of biological interest by matrix-assisted laser desorption ionization *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7, 1090-1094.
53. Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E., and Sisodia, S. S., (1996) The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry *J. Biol. Chem.* 271, 31894-31902.
54. Pitt, J. J. and Gorman, J. J., (1997) Oligosaccharide characterization and quantitation using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Anal. Biochem.* 248, 63-75.
55. Jorgensen, M., Bergkvist, K. S., and Welinder, K. G., (2006) Quantification of defensins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Anal. Biochem.* 358, 295-297.
56. Sugiyama, E., Hara, A., and Uemura, K., (1999) A quantitative analysis of serum sulfatide by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with delayed ion extraction *Anal. Biochem.* 274, 90-97.
57. Bungert, D., Heinzle, E., and Tholey, A., (2004) Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the determination of enzyme activities *Anal. Biochem.* 326, 167-175.
58. Li, Y. L. and Gross, M. L., (2004) Ionic-liquid matrices for quantitative analysis by MALDI-TOF mass spectrometry *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 1833-1837.
59. Mirgorodskaya, O. A., Korner, R., Novikov, A., and Roepstorff, P., (2004) Absolute quantitation of proteins by a combination of acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry *Anal. Chem.* 76, 3569-3575.
60. Gobom, J., Kraeuter, K. O., Persson, R., Steen, H., Roepstorff, P., and Ekman, R., (2000) Detection and quantification of neurotensin in human brain tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Anal. Chem.* 72, 3320-3326.
61. Dekker, L. J., Dalebout, J. C., Siccama, I., Jenster, G., Sillevs Smitt, P. A., and Luiders, T. M., (2005) A new method to analyze matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight peptide profiling mass spectra *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 865-870.
62. Chaurand, P., Schwartz, S. A., and Caprioli, R. M., (2002) Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 676-681.
63. Todd, P. J., Schaaff, T. G., Chaurand, P., and Caprioli, R. M., (2001) Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization *J. Mass Spectrom.* 36, 355-369.
64. Caprioli, R. M., Farmer, T. B., and Gile, J., (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS *Anal. Chem.* 69, 4751-4760.

65. Reyzer, M. L. and Caprioli, R. M., (2007) MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 29-35.
66. Lemaire, R., Tabet, J. C., Ducoroy, P., Hendra, J. B., Salzert, M., and Fournier, I., (2006) Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging *Anal. Chem.* 78, 809-819.
67. Wilkinson, W. R., Gusev, A. I., Proctor, A., Houalla, M., and Hercules, D. M., (1997) Selection of internal standards for quantitative analysis by matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) time-of-flight mass spectrometry *Fres. J. Anal. Chem.* 357, 241-248.
68. Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A., and Hercules, D. M., (1996) Direct quantitative analysis of peptides using matrix assisted laser desorption ionization *Fres. J. Anal. Chem.* 354, 455-463.
69. Muddiman, D. C., Gusev, A. I., Martin, L. B., and Hercules, D. M., (1996) Direct quantification of cocaine in urine by time-of-flight mass spectrometry *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 354, 103-110.
70. Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A., and Hercules, D. M., (1995) Improvement of Signal Reproducibility and Matrix/Comatrix Effects in Maldi Analysis *Anal. Chem.* 67, 1034-1041.
71. Muddiman, D. C., Nicola, A. J., Proctor, A., and Hercules, D. M., (1996) Important aspects concerning the quantification of biomolecules by time-of-flight secondary-ion mass spectrometry *Applied Spectroscopy* 50, 161-166.
72. Muddiman, D. C., Gusev, A. I., Stoppeklanger, K., Proctor, A., Hercules, D. M., Tata, P., Venkataraman, R., and Diven, W., (1995) Simultaneous Quantification of Cyclosporine-A and Its Major Metabolites by Time-Of-Flight Secondary-Ion Mass-Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass-Spectrometry Utilizing Data-Analysis Techniques - Comparison with High-Performance Liquid-Chromatography *Journal of Mass Spectrometry* 30, 1469-1479.
73. Nelson, R. W., Mclean, M. A., and Hutchens, T. W., (1994) Quantitative-Determination of Proteins by Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry *Analytical Chemistry* 66, 1408-1415.
74. Tang, X. D., Sadeghi, M., Olumee, Z., and Vertes, A., (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionization by two collinear subthreshold laser pulses *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11, 484-488.
75. Jesus A.Gutierrez, J.A.Dorocke, M.D.Knierman, V.Gelfanova, R.E.Higgs, N.L.Koh, and J.E.Hale, (2005) Quantitative determination of peptides using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *BioTechniques* 38, S13-S17.
76. Chaurand, P., Schriver, K. E., and Caprioli, R. M., (2007) Instrument design and characterization for high resolution MALDI-MS imaging of tissue sections *J. Mass Spectrom.* 42, 476-489.

77. Chaurand, P., Cornett, D. S., and Caprioli, R. M., (2006) Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 431-436.
78. Chaurand, P., Sanders, M. E., Jensen, R. A., and Caprioli, R. M., (2004) Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections *Am. J. Pathol.* 165, 1057-1068.
79. Chaurand, P., Fouhécourt, S., DaGue, B. B., Xu, B. J., Reyzer, M. L., Orgebin-Crist, M. C., and Caprioli, R. M., (2003) Profiling and imaging proteins in the mouse epididymis by imaging mass spectrometry *Proteomics*. 3, 2221-2239.
80. Chaurand, P. and Caprioli, R. M., (2002) Direct profiling and imaging of peptides and proteins from mammalian cells and tissue sections by mass spectrometry *Electrophoresis* 23, 3125-3135.
81. Chaurand, P., DaGue, B. B., Pearsall, R. S., Threadgill, D. W., and Caprioli, R. M., (2001) Profiling proteins from azoxymethane-induced colon tumors at the molecular level by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry *Proteomics*. 1, 1320-1326.
82. Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E., and Caprioli, R. M., (2001) Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues *Nat. Med.* 7, 493-496.
83. Stoeckli, M., Farmer, T. B., and Caprioli, R. M., (1999) Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 67-71.
84. Pacholski, M. L. and Winograd, N., (1999) Imaging with mass spectrometry *Chem. Rev.* 99, 2977-3006.
85. Aerni, H. R., Cornett, D. S., and Caprioli, R. M., (2006) Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation *Anal. Chem.* 78, 827-834.
86. Khatib-Shahidi, S., Andersson, M., Herman, J. L., Gillespie, T. A., and Caprioli, R. M., (2006) Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry *Anal. Chem.* 78, 6448-6456.
87. Reyzer, M. L. and Caprioli, R. M., (2005) MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery *J. Proteome. Res.* 4, 1138-1142.
88. Chaurand, P., Schwartz, S. A., Reyzer, M. L., and Caprioli, R. M., (2005) Imaging mass spectrometry: principles and potentials *Toxicol. Pathol.* 33, 92-101.
89. Chaurand, P., Schwartz, S. A., and Caprioli, R. M., (2004) Profiling and imaging proteins in tissue sections by MS *Analytical Chemistry* 76, 86A-93A.
90. Jakob Albrethsen, (2007) Reproducibility in Protein Profiling by MALDI-TOF Mass Spectrometry *Clin. Chem.* 53, 1-7.

91. Tholey, A. and Heinze, E., (2006) Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 24-37.
92. Trimpin, S., Rouhanipour, A., Az, R., Rader, H. J., and Mullen, K., (2001) New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1364-1373.
93. Knochenmuss, R. and Zenobi, R., (2003) MALDI ionization: the role of in-plume processes *Chem. Rev.* 103, 441-452.
94. Schlosser, G., Pocsfalvi, G., Huszar, E., Malorni, A., and Hudecz, F., (2005) MALDI-TOF mass spectrometry of a combinatorial peptide library: effect of matrix composition on signal suppression *J. Mass Spectrom.* 40, 1590-1594.
95. Nicola, A. J., Gusev, A. I., Proctor, A., Jackson, E. K., and Hercules, D. M., (1995) Application of the fast-evaporation sample preparation method for improving quantification of angiotensin II by matrix-assisted laser desorption/ionization *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 1164-1171.
96. Garden, R. W. and Sweedler, J. V., (2000) Heterogeneity within MALDI samples as revealed by mass spectrometric imaging *Anal. Chem.* 72, 30-36.
97. Knochenmuss, R., Dubois, F., Dale, M. J., and Zenobi, R., (1996) The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 871-877.
98. Knochenmuss, R., Karbach, V., Wiesli, U., Breuker, K., and Zenobi, R., (1998) The matrix suppression effect in matrix-assisted laser desorption/ionization: Application to negative ions and further characteristics *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 529-534.
99. Jespersen, S., Niessen, W. M. A., Tjaden, U. R., and Vandergreef, J., (1995) Quantitative Bioanalysis Using Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Mass-Spectrometry *Journal of Mass Spectrometry* 30, 357-364.
100. Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A., and Hercules, D. M., (1993) Quantitative-Analysis of Peptides by Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry *Appl. Spectros.* 47, 1091-1092.
101. Tang, K., Allman, S. L., Jones, R. B., and Chen, C. H., (1993) Quantitative-Analysis of Biopolymers by Matrix-Assisted Laser-Desorption *Analytical Chemistry* 65, 2164-2166.
102. Smirnov, I. P., Zhu, X., Taylor, T., Huang, Y., Ross, P., Papayanopoulos, I. A., Martin, S. A., and Pappin, D. J., (2004) Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry *Anal. Chem.* 76, 2958-2965.
103. Amado, F. M. L., Domingues, P., SantanaMarques, M. G., FerrerCorreia, A. J., and Tomer, K. B., (1997) Discrimination effects and sensitivity variations in matrix-assisted laser desorption/ionization *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 1347-1352.

104. Chan, T. W. D., Colburn, A. W., and Derrick, P. J., (1991) Matrix-Assisted Uv Laser Desorption - Suppression of the Matrix Peaks *Organic Mass Spectrometry* 26, 342-344.
105. Li, L., Garden, R. W., and Sweedler, J. V., (2000) Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling *Trends Biotechnol.* 18, 151-160.
106. Mormann, M., Bashir, S., Derrick, P. J., and Kuck, D., (2000) Gas-phase basicities of the isomeric dihydroxybenzoic acids and gas-phase acidities of their radical cations *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11, 544-552.
107. Cohen, S. L. and Chait, B. T., (1996) Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins *Anal. Chem.* 68, 31-37.
108. Knochenmuss, R., Stortelder, A., Breuker, K., and Zenobi, R., (2000) Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization *J. Mass Spectrom.* 35, 1237-1245.
109. Zenobi, R. and Knochenmuss, R., (1998) Ion formation in MALDI mass spectrometry *Mass Spectrom. Rev.* 17, 337-366.
110. Olumee, Z. and Vertes, A., (1998) Protonation of Gly(n) homologues in matrix-assisted laser desorption ionization *Journal of Physical Chemistry B* 102, 6118-6122.
111. Dreisewerd, K., Schurenberg, M., Karas, M., and Hillenkamp, F., (1996) Matrix-assisted laser desorption/ionization with nitrogen lasers of different pulse widths *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 154, 171-178.
112. Knochenmuss, R., Lehmann, E., and Zenobi, R., (1998) Polymer cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization *Eur. Mass Spectrom.* 4, 421-426.
113. Kinsel, G. R., Gimon-Kinsel, M. E., Gillig, K. J., and Russell, D. H., (1999) Investigation of the dynamics of matrix-assisted laser desorption ionization ion formation using an electrostatic analyzer/time-of-flight mass spectrometer *Journal of Mass Spectrometry* 34, 684-690.
114. Krause, E., Wenschuh, H., and Jungblut, P. R., (1999) The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins *Anal. Chem.* 71, 4160-4165.
115. Brancia, F. L., Oliver, S. G., and Gaskell, S. J., (2000) Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2070-2073.
116. Beardsley, R. L., Karty, J. A., and Reilly, J. P., (2000) Enhancing the intensities of lysine-terminated tryptic peptide ions in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2147-2153.
117. Laugesen, S. and Roepstorff, P., (2003) Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 992-1002.

118. Distler, A. M. and Allison, J., (2001) Improved MALDI-MS analysis of oligonucleotides through the use of fucose as a matrix additive *Anal. Chem.* 73, 5000-5003.
119. Billeci, T. M. and Stults, J. T., (1993) Tryptic mapping of recombinant proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry *Anal. Chem.* 65, 1709-1716.
120. Chou, J. Z., Kreek, M. J., and Chait, B. T., (1994) Matrix-Assisted Laser-Desorption Mass-Spectrometry of Biotransformation Products of Dynorphin-A In-Vitro *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 5, 10-16.
121. Dai, Y., Whittall, R. M., and Li, L., (1999) Two-layer sample preparation: a method for MALDI-MS analysis of complex peptide and protein mixtures *Anal. Chem.* 71, 1087-1091.
122. Vorm, O., Roepstorff, P., and Mann, M., (1994) Improved Resolution and Very High-Sensitivity in Maldi ToF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation *Anal. Chem.* 66, 3281-3287.
123. Karas, M., Ehring, H., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., Hillenkamp, F., Grehl, M., and Krebs, B., (1993) Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Mass-Spectrometry with Additives to 2,5-Dihydroxybenzoic Acid *Org. Mass Spectrom.* 28, 1476-1481.
124. Nordhoff, E., Schurenberg, M., Thiele, G., Lubbert, C., Kloeppel, K. D., Theiss, D., Lehrach, H., and Gobom, J., (2003) Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports *Int. J. Mass Spectrom.* 226, 163-180.
125. Zabet-Moghaddam, M., Heinzle, E., Lasaosa, M., and Tholey, A., (2006) Pyridinium-based ionic liquid matrices can improve the identification of proteins by peptide mass-fingerprint analysis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 215-224.
126. Armstrong, D. W., Zhang, L. K., He, L., and Gross, M. L., (2001) Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry *Anal. Chem.* 73, 3679-3686.
127. Belghazi, M., Bathany, K., Hountondji, C., Grandier-Vazeille, X., Manon, S., and Schmitter, J. M., (2001) Analysis of protein sequences and protein complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry *Proteomics.* 1, 946-954.
128. Karas, M. and Kruger, R., (2003) Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism *Chem. Rev.* 103, 427-440.
129. Kruger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Gluckmann, M., and Karas, M., (2001) Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes *Anal. Chem.* 73, 5812-5821.
130. Kruger, R. and Karas, M., (2002) Formation and fate of ion pairs during MALDI analysis: anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 1218-1226.

131. Dreisewerd, K., (2003) The desorption process in MALDI *Chem. Rev.* 103, 395-426.
132. Bogan, M. J. and Agnes, G. R., (2003) Time-of-flight mass spectrometric analysis of ions produced from adjacent sample spots irradiated simultaneously by a single 337 nm laser *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2557-2562.
133. Papantonakis, M. R., Kim, J., Hess, W. P., and Haglund, R. F., Jr., (2002) What do matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra reveal about ionization mechanisms? *J. Mass Spectrom.* 37, 639-647.
134. Krutchinsky, A. N., Dolguine, A. I., and Khodorkovski, M. A., (1995) Matrix-assisted laser desorption ionization of neutral clusters composed of matrix and analyte molecules *Anal. Chem.* 67, 1963-1967.
135. Chang, W. C., Huang, L. C., Wang, Y. S., Peng, W. P., Chang, H. C., Hsu, N. Y., Yang, W. B., and Chen, C. H., (2007) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited *Anal. Chim. Acta* 582, 1-9.
136. Zhang, J. and Zenobi, R., (2004) Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry *J. Mass Spectrom.* 39, 808-816.
137. Erb, W. J., Hanton, S. D., and Owens, K. G., (2006) A study of gas-phase cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2165-2169.
138. Rashidezadeh, H. and Guo, B. C., (1998) Investigation of metal attachment to polystyrenes in matrix-assisted laser desorption ionization *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 9, 724-730.
139. Ehring, H., Karas, M., and Hillenkamp, F., (1992) Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic-Molecules and Relevance for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry *Organic Mass Spectrometry* 27, 472-480.
140. Llenes, C. F. and Omalley, R. M., (1992) Cation Attachment in the Analysis of Polystyrene and Polyethylene-Glycol by Laser-Desorption Time-Of-Flight Mass-Spectrometry *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 6, 564-570.
141. Vertes, A., Irinyi, G., and Gijbels, R., (1993) Hydrodynamic Model of Matrix-Assisted Laser-Desorption Mass-Spectrometry *Anal. Chem.* 65, 2389-2393.
142. Lehmann, E., Knochenmuss, R., and Zenobi, R., (1997) Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: Contribution of pre-formed ions *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11, 1483-1492.
143. Wong, C. K. L. and Chan, T. W. D., (1997) Cationization processes in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Attachment of divalent and trivalent metal ions *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11, 513-519.
144. Knochenmuss, R. and Vertes, A., (2000) Time-delayed 2-pulse studies of MALDI matrix ionization mechanisms *Journal of Physical Chemistry B* 104, 5406-5410.

145. Eisenhart, C., (1939) The interpretation of certain regression methods and their use in biological and industrial research *Ann. Math. Stat.* 10., 162-186.
146. R.E.Parker, (1973) Introductory Statistics for Biolog
147. Szabó Gábor, (2005) Bevezetés az epidemiológiai kutatások módszertanába II.
148. Juvanecz Iréneusz and Paksy András, (1982) Orvosi Biometria
149. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L., and Rose, I. A., (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 1783-1786.
150. Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L., and Hershko, A., (1980) ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 1365-1368.
151. Ciechanover, A., (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 79-86.
152. Pickart, C. M., (2001) Mechanisms underlying ubiquitination *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503-533.
153. Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M., (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers *Trends Biochem. Sci.* 28, 321-328.
154. Wilkinson, K. D., (2005) The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 15280-15282.
155. Pickart, C. M., (2000) Ubiquitin in chains *Trends Biochem. Sci.* 25, 544-548.
156. Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., and Varshavsky, A., (1989) A Multiubiquitin Chain Is Confined to Specific Lysine in A Targeted Short-Lived Protein *Science* 243, 1576-1583.
157. Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L. Y., Braun, A., You, J. X., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J., (2000) Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain *Cell* 103, 351-361.
158. Hofmann, R. M. and Pickart, C. M., (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair *Cell* 96, 645-653.
159. Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L., and Finley, D., (1995) A Ubiquitin Mutant with Specific Defects in Dna-Repair and Multiubiquitination *Molecular and Cellular Biology* 15, 1265-1273.
160. Spence, J., Gali, R. R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., and Finley, D., (2000) Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain *Cell* 102, 67-76.

161. Mollah, S., Wertz, I. E., Phung, Q., Arnott, D., Dixit, V. M., and Lill, J. R., (2007) Targeted mass spectrometric strategy for global mapping of ubiquitination on proteins *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 3357-3364.
162. Unwin, R. D., Griffiths, J. R., Leverentz, M. K., Grallert, A., Hagan, I. M., and Whetton, A. D., (2005) Multiple reaction monitoring to identify sites of protein phosphorylation with high sensitivity *Mol. Cell Proteomics* 4, 1134-1144.